



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**“ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DE GHRELINA
Y SU RECEPTOR SOBRE LOS CIRCUITOS
HIPOTALÁMICOS QUE CONTROLAN EL BALANCE
ENERGÉTICO”**

Tesista: Lic. Gimena Fernandez

Director: Dr. Mario Perelló

Codirectora: Dra. Agustina Cabral

Año: 2019

El presente Trabajo de Tesis Doctoral fue realizado
en el Laboratorio de Neurofisiología del Instituto
Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) bajo
la dirección del Dr. Mario Perelló y la codirección de
la Dra. Agustina Cabral.



***Especialmente dedicada a mi familia y a mi
amor por su incondicional apoyo durante todos
estos años***

Agradecimientos

Mario, gracias por darme la oportunidad de formar parte de tu equipo de trabajo, por todas las oportunidades que me brindaste, por compartir tu experiencia conmigo, por todos tus consejos, tu contención incluso hasta por tus retos. Me acompañaste en cada experimento, cada resultado y cada discusión, gracias por siempre confiar en mí y alentarme a que yo también lo hiciera, gracias por estar siempre al lado mío y principalmente, por tu paciencia infinita. Te admiro y simplemente no me alcanzan las palabras para agradecerte todos estos años compartidos.

Agus, fuiste mi maestra desde el primer día que entré al mundo de la ciencia. Tampoco me alcanzan las palabras para agradecerte cada paso que dimos juntas, por siempre darme fuerzas para seguir adelante y que no baje los brazos, gracias por tu confianza infinita, tus consejos, por estar al lado mío ayudándome cada vez que te necesité (que fueron muchas). No puedo estar más orgullosa y agradecida de que hayas co-dirigido este trabajo.

Les quiero agradecer muy especialmente a todos mis compañeros del Laboratorio de Neurofisiología, sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por compartir conmigo tantos años de esfuerzo y dedicación siempre a la par y con una sonrisa. Nico y Majo, los genios de la microscopia, gracias por estar siempre, ayudándome y transmitiéndome todo lo que saben. Sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible. Siempre dije que trabajando en equipo se llega más lejos, y estoy orgullosa del gran equipo de trabajo que formamos a lo largo de todos estos años.

Quiero agradecerle a las autoridades del IMBICE por darme un lugar para aprender y crecer personal y profesionalmente. A CONICET, a la CIC-PBA, a la UNLP y a la ANPCyT, por brindarme todos los medios económicos que permitieron llevar a cabo este trabajo de Tesis Doctoral. También quiero agradecer especialmente al Programa Bec.AR que me permitió conocer gente maravillosa en Francia. Gracias Dr. Epelbaum y Dra. Tolle por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar parte de este trabajo con ustedes.

Gracias a todos mis amigos de toda la vida por apoyarme en todos los momentos lindos y no tan lindos. Gracias Ji porque a pesar de no estar en el ambiente científico y a veces no entender mis locuras, siempre lo intestaste, me apoyaste, estuviste conmigo y me ayudaste cada vez que te necesite. Gracias especialmente a mi amiga del alma Mai por acompañarme en cada paso, por estar conmigo en cada experimento nocturno y fines de semana en el laboratorio haciéndome el aguante, gracias por el apoyo, la contención, la confianza y tu incondicionalidad. Gracias Ye por todas tus palabras de aliento, por tu preocupación constante y por siempre tener las palabras justas para hacerme reír. Gracias por hacerme sentir que estas muy cerca mío a pesar de estar lejos físicamente.

Finalmente, nunca voy a encontrar las palabras justas para agradecerle a mi familia. Papa, Mamá, Juli, gracias por su apoyo incondicional, por ser mi cable a tierra, por la infinita confianza, por estar siempre orgullosos de mí y hacérmelo saber cada día. Gracias por la paciencia que siempre me han tenido, por todas las oportunidades que me dieron y por enseñarme a luchar y pelear por lo que quiero. Gracias por el amor infinito que me hacen llegar cada día. Gracias a mis abuelos, tíos, primos. Esta Tesis es esfuerzo de todos ustedes también.

Y por supuesto, gracias Dani, mi amor, que compartiste conmigo la última parte esta Tesis (la peor parte a mi entender), me ayudaste y acompañaste en todo momento, siempre alentándome a no bajar los brazos. Gracias por amarme, comprenderme y por la paciencia con la que soportaste la escritura de esta Tesis. Gracias por ser el mejor compañero que pueda haber tenido. Y por supuesto, gracias a toda la familia Bertora por el apoyo incondicional que me brindan día a día.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN.....	6
1. Homeostasis energética	7
2. Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos	8
3. Regulación hipotalámica del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA)	10
4. Sistema ghrelina/GHSR	13
Ghrelina	13
Desacil-ghrelina	14
Receptor de ghrelina	14
5. Funciones principales del sistema ghrelina/GHSR en el hipotálamo	16
Acciones orexigenicas	16
Acciones sobre el eje HHA.....	17
6. Control de la homeostasis energética en situaciones de déficit energético	18
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. Animales Experimentales	23
2. Reactivos.....	24
3. Genotipificación de los animales	26
4. Cirugías estereotáxicas	26
5. Procedimientos experimentales	27
6. Perfusión y preparación de muestras de cerebro	35
7. Inmunohistoquímicas (IHQs) y tinciones	36
8. Análisis Neuroanatómico Cuantitativo.....	38
9. Obtención de Imágenes	40
10. Análisis estadístico	40
RESULTADOS.....	42
CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DE LA SEÑALIZACIÓN DEL SISTEMA GHRELINA/GHSR EN LA HIPERFAGIA COMPENSATORIA INDUCIDA POR AYUNO	43
a) Análisis de los patrones de ingesta, actividad locomotora y cambios del peso corporal luego un ayuno.....	44
b) Influencia del balance energético negativo sobre el sistema ghrelina/GHSR	47
c) Influencia del balance energético negativo sobre los principales neuropéptidos del ARC	49
d) Implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en las respuestas hiperfágicas compensatorias observadas luego de un ayuno.....	51
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DE LA SEÑALIZACIÓN DEL SISTEMA GHRELINA/GHSR EN LA ACTIVACIÓN DE LAS NEURONAS CRF HIPOFISIOTRÓPICAS EN UNA CONDICIÓN DE AYUNO	57
a) Estudio de la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en una condición de ayuno	58
b) Estudio de las inervaciones del NPV en una condición de ayuno	59

c)	Estudio de la implicancia de la integridad del núcleo ARC en la activación de las neuronas CRF y los cambios en las inervaciones de las neuronas NPY/AgRP al NPV	61
d)	Estudio de la implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF y en los cambios de las inervaciones de las neuronas NPY/AgRP al NPV	66
CAPÍTULO 3: ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DE LA DAG SOBRE EL SISTEMA GHRELINA/GHSR A NIVEL HIPOTALÁMICO		75
a)	Estudio de la accesibilidad y activación de los núcleos hipotalámicos en respuesta a la administración central de la DAG	76
b)	Estudio de la modulación de la señalización del sistema ghrelina/GHSR por la DAG	80
c)	Estudio de la bioactividad de la DAG a través de la evaluación del efecto orexigénico	81
DISCUSIÓN.....		85
	Consideraciones metodológicas y técnicas de los estudios realizados.....	86
	Capítulo 1. Estudio del rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la hiperfagia compensatoria inducida por ayuno.	92
	Capítulo 2. Estudio del rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en una condición de ayuno	97
	Capítulo 3: Estudio del rol modulador de la DAG sobre el sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico	102
CONCLUSIONES.....		103
BIBLIOGRAFÍA.....		103

ABREVIATURAS

3V	Tercer ventrículo
5TM	5 dominios transmembrana
7TM	7 dominios transmembrana
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AgRP	Péptido Relacionado al gen de Agouti
ARC	Núcleo Arcuato
ARCd	Núcleo Arcuato dorsal
ARCvl	Núcleo Arcuato ventro-lateral
ARCvm	Núcleo Arcuato ventro-medial
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
AP	Área Postrema
CART	Neuropéptido transcripto regulado por cocaína y anfetamina
CDV	Complejo Dorsal del Vago
CRF	Factor liberador de corticotropina
Ct	Ciclo umbral
DAG	Desacil-ghrelina
DMH	Núcleo Dorsomedial
DO	Densidad óptica
DVC	Complejo Dorsal del Vago
GFP	Proteína fluorescente verde
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Eminencia Media
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GH	Hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de hormona de crecimiento
GHSR	Receptor de ghrelina
GOAT	Ghrelina-O-acetil transferasa
HCl	Ácido clorhídrico
HHA	Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal
ICV	Intra-cerebro-ventricular
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Intraperitoneal
IR	Inmuno-reactivo
KO	Knock-Out
LHA	Área Hipotalámica Lateral
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
MCR	Receptor de melanocortinas

Abreviaturas

MSG	Monosodio glutamato
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
NaCl	Cloruro de Sodio
n.s	No significativo
NPV	Núcleo Paraventricular
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
PBN	Núcleo Parabraquial
PBS	Buffer fosfato-salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POMC	Pro-opiomelanocortina
RT	Transcriptasa Reversa
SC	Subcutáneo
SNC	Sistema nervioso central
TBC	<i>Cassette</i> de bloqueo de la transcripción
VMH	Núcleo Ventromedial
Y	Receptor de NPY
WT	<i>Wild Type</i>

INTRODUCCIÓN

1. Homeostasis energética

Entre los aspectos fundamentales que caracterizan a los seres vivos se encuentra la capacidad para adaptarse a cambios bruscos bajo distintas condiciones ambientales. El término homeostasis (gr. *homeo*- constante + gr. *stasis*, mantener) se utiliza para describir los mecanismos que regulan y mantienen constantes las condiciones del medio interno de un organismo, a pesar de las oscilaciones en el medio externo. Estos procesos pueden abarcar funciones como el balance energético corporal, el balance hidrosalino, la temperatura corporal, los niveles de glucosa sanguínea, entre otros.

El balance energético es un proceso fisiológico regulado que mantiene el equilibrio entre la ingesta y el gasto de energía (Broberger, 2005, Adan and van Dijk, 2006), Hill et al. (2012). Dicho proceso se encuentra fuertemente regulado por el sistema nervioso central (SNC). El SNC es capaz de monitorear el estado energético del organismo, integrar la información y responder, en consecuencia, mediante diversos mecanismos homeostáticos tendientes a minimizar el impacto de las fluctuaciones energéticas (Schwartz et al., 2000). Los circuitos neuronales homeostáticos más importantes encargados de regular el balance energético están localizados en el hipotálamo y el tronco encefálico, los cuales se encuentran altamente regulados e interconectados entre sí (Schneeberger et al., 2014).

El hipotálamo se sitúa en el diencefalo, concretamente en la parte ventral del tálamo y está compuesto por diversos núcleos cerebrales relevantes en el control del balance energético (Schneeberger et al., 2014). Entre los núcleos hipotalámicos más importantes en el control del balance energético pueden mencionarse: el Núcleo Arcuato (ARC), el Núcleo Ventromedial (VMH), el Área Lateral (LHA), el Núcleo Dorsomedial (DMH) y el Núcleo Paraventricular (NPV). Dichos núcleos hipotalámicos están altamente vinculados entre sí, y participan del control de diversas funciones biológicas. Sin embargo, algunos poseen un rol más protagónico en el control de algunas funciones específicas. Por ejemplo, el ARC juega un rol preponderante en el control de la ingesta de alimentos, mientras que el NPV es el encargado de regular los principales ejes neuroendocrinos, como el eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA). Por lo tanto, la función principal del hipotálamo es la integración de señales periféricas y neuronales que proporcionan un estricto control sobre diversos procesos conductuales, autónomos y/o endócrinos.

El tronco encefálico se sitúa en la parte posterior del cerebro donde se une el mesencéfalo, el puente del tronco-encefálico y el bulbo raquídeo. Está compuesto por diversas regiones entre las que se destaca el Complejo Dorsal del Vago (DVC, de sus siglas en inglés para *dorsal vagal complex*). El DVC está compuesto por el Núcleo del Tracto Solitario (NTS), el Área Postrema (AP) y el Complejo Motor Dorsal del Vago, y controla funciones asociadas con el sistema nervioso autónomo, como la presión arterial, el balance hídrico, la frecuencia respiratoria, la motilidad gastrointestinal, entre otras (Barraco, 1994). El DVC recibe e integra información proveniente de señales periféricas como metabolitos y hormonas circulantes, de aferencias vagales provenientes del tracto gastrointestinal y de aferencias neuronales provenientes de otros núcleos cerebrales hipotalámicos y extra-hipotalámicos.

2. Regulación hipotalámica de la ingesta de alimentos

El ARC es considerado uno de los principales núcleos orquestadores de la regulación del balance energético. Se localiza en la parte inferior del hipotálamo a ambos lados del tercer ventrículo y próximo a la eminencia media (EM). La EM es un órgano circunventricular ubicado en el límite inferior del hipotálamo que permite el acceso rápido y pasivo de moléculas circulantes a través de los capilares fenestrados del sistema porta-hipofisario que se proyectan hacia la parte ventro-medial del ARC (ARCvm) (Schaeffer M 2013). De esta manera, la irrigación de la EM facilita el transporte de señales metabólicas y hormonales periféricas hacia el ARC, el cual integra toda la información recibida con la información proveniente de otras regiones del cerebro (Saper et al., 2002, Wang et al., 2015). En el ARC se encuentran dos poblaciones de neuronas claramente diferenciadas que integran las señales del balance energético y ejercen efectos opuestos. Una de estas poblaciones co-expresa el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada a Agouti (AgRP, de sus siglas en inglés para *agouti-related protein*), con efectos orexigénicos, y la otra co-expresa el precursor pro-opiomelanocortina (POMC) y el neuropéptido transcripto regulado por cocaína y amfetamina (CART, de sus siglas en inglés para *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*), con efectos anorexigénicos (Sohn, 2015). Estas neuronas pueden considerarse de primer orden en el sentido que responden directamente a los niveles de metabolitos y hormonas en circulación (**Figura 1**).

Las neuronas NPY/AgRP se localizan en el ARCvm y son la principal población orexigénica en el SNC. Mientras que NPY se expresa en diversas áreas del cerebro (Gehlert et al., 1987), AgRP se expresa exclusivamente en el ARC co-localizando con la mayoría de las neuronas NPY ubicadas en este núcleo y con el neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA, de sus siglas en inglés para *gamma amino butyric acid*) (Horvath et al., 1997, Hahn et al., 1998). NPY media sus acciones vía 6 receptores acoplados a proteína G denominados Y1-6 (Parker et al., 2002), aunque sus acciones orexigénicas son ejercidas principalmente a través del Y1 y el Y5 (Nguyen et al., 2012). AgRP actúa como un antagonista endógeno de los receptores de melanocortina MC3R y MC4R (de sus siglas en inglés para *melanocortin 3-4 receptor*) por lo que bloquea la señal anorexigénica de las melanocortinas (Ollmann et al., 1997). Varios estudios muestran que NPY y AgRP tienen elevada actividad orexigénica. Así, se ha mostrado que la activación selectiva de las neuronas NPY/AgRP mediante técnicas optogenéticas (Aponte et al., 2011) o farmacogenéticas (Krashes et al., 2011) estimula rápidamente la ingesta de alimentos en ratones alimentados *ad libitum*, mientras que, de forma contraria, la inhibición de estas neuronas disminuye la ingesta en ratones previamente ayunados (Krashes et al., 2011). Asimismo, se ha reportado que la ablación de las neuronas NPY/AgRP en ratones adultos resulta en una disminución aguda de la ingesta de alimentos (Gropp et al., 2005, Luquet et al., 2005). Por otro lado, la expresión de ambos neuropéptidos refleja el estado nutricional del organismo, aumentando su expresión y secreción en estados de ayuno y disminuyendo durante la ingesta (Yang et al., 2011, Liu et al., 2012). Además, se ha mostrado que las neuronas NPY/AgRP inervan a las neuronas POMC disminuyendo sus efectos anorexigénicos a través de la liberación sináptica del neurotransmisor inhibitorio GABA formando, de esta manera, un circuito neuronal local de regulación del apetito (Cowley et al., 2001, Tong et al., 2008).

Las neuronas POMC se localizan en la parte ventro-lateral del ARC (ARCvl) y son una de las principales poblaciones anorexigénicas en el SNC. Estudios recientes de secuenciación de ARN de célula

única han mostrado que son una población muy heterogénea debido al evidente grado de co-localización que presentan con el neuropéptido AgRP en una sub-población de ellas (Campbell et al., 2017, Lam et al., 2017). El hecho de que estas neuronas, como cualquier otra neurona del SNC, presenten cierto grado de heterogeneidad, nos muestra que los datos obtenidos simplemente reflejan a la población más dominante. Estas neuronas liberan diversos péptidos derivados de la proteólisis de POMC que son miembros de las familias de opioides y de las melanocortinas. El péptido opioide generado es la β -endorfina, mientras que las melanocortinas incluyen a la hormona adrenocorticotropina (ACTH, de sus siglas en inglés para *adrenocorticotropin hormone*) y a las hormonas estimulantes de melanocitos α , β y γ (MSH de sus siglas en inglés para *melanocyte-stimulating hormones*). Todas las melanocortinas tienen la misma secuencia característica de aminoácidos centrales la cual es necesaria para unirse a una familia de cinco receptores acoplados a proteína G denominados receptores de melanocortinas (MC1-5R) (Cortes et al., 2014). Sin embargo, la regulación del balance energético, principalmente llevado a cabo por la α -MSH, se encuentra mediada por los receptores MC3R y MC4R, expresados en diversas regiones del SNC (Butler et al., 2017). El rol crítico de POMC en la regulación del metabolismo se evidencia en estudios que muestran que la activación de estas neuronas del ARC disminuye la ingesta de alimento (Aponte et al., 2011, Zhan et al., 2013). Asimismo, la ablación o el silenciamiento de estas neuronas conduce a hiperfagia severa y obesidad (Smart et al., 2006, Bumashny et al., 2012, Zhan et al., 2013). Por otro lado, se ha reportado que en condiciones de ayuno el nivel de expresión de POMC disminuye, mientras que el aumento de las reservas energéticas incrementa nuevamente su expresión (Mercer et al., 2014).

Las diferentes poblaciones neuronales del ARC ejercen sus funciones a través de distintos puntos de relevo en otras áreas del hipotálamo las cuales actúan, en parte, como neuronas de segundo orden de los circuitos que regulan aspectos homeostáticos de la ingesta de alimentos. Las neuronas NPY/AgRP envían proyecciones tanto al LHA como al NPV, y la activación optogenética de estas proyecciones resulta suficiente para inducir el consumo de alimento de una manera comparable a la activación de las neuronas NPY/AgRP del ARC (Betley et al., 2013). Además, estas neuronas también se proyectan al Núcleo Parabraquial (PBN), un punto de relevo que conecta el cerebro anterior con el posterior, inhibiendo su actividad neuronal a través de la liberación pre-sináptica de GABA manteniendo, de esta manera, el tono orexigénico (Dietrich and Horvath, 2009, Wu et al., 2009). Por otro lado, las neuronas POMC también inervan densamente al NPV, como así también al LHA, al VMH y DMH hipotalámicos, entre otras regiones (Waterson and Horvath, 2015). Estas neuronas de segundo orden procesan la información recibida y se proyectan a múltiples circuitos intra- y extra-hipotalámicos, generando una respuesta integrada tanto en la ingesta como en el gasto de energía (Roh et al., 2016).

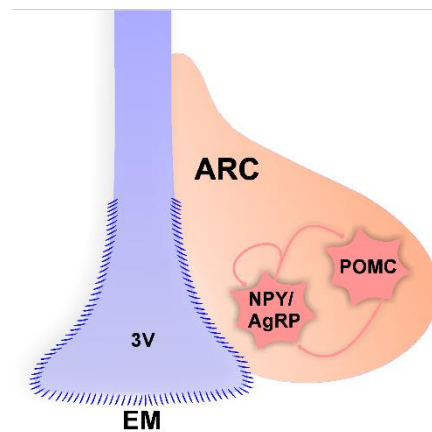


Figura 1: Dibujo esquemático de la localización de las principales poblaciones neuronales del ARC implicadas en el control homeostático de la ingesta de alimentos. Las abreviaturas indican: 3V: tercer ventrículo; ARC Núcleo Arcuato; EM eminencia media.

3. Regulación hipotalámica del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HHA)

Entre los ejes neuroendocrinos encargados de mantener la homeostasis corporal se destaca el eje HHA. Ante la presencia de un estresor, definido como un estado de amenaza real o percibida para la homeostasis, el eje HHA activa un complejo rango de respuestas que involucran a los sistemas endocrinos, nervioso e inmune, conocidas colectivamente como respuesta al estrés. Así, la rápida activación del eje HHA ante un desafío homeostático induce la liberación de glucocorticoides, esenciales para mantener las funciones vitales y asegurar la supervivencia (Joels and Baram, 2009).

A nivel hipotalámico el eje HHA está controlado por las neuronas CRF del NPV que sintetizan el factor liberador de corticotropina (CRF, de sus siglas en inglés para *corticotropin-releasing factor*). El CRF es transportado hacia la EM liberándose en el sistema porta-hipofisario. Aquí, alcanza rápidamente a las células corticotropas de la hipófisis anterior, estimulando la síntesis y secreción de la hormona ACTH. Por último, la ACTH actúa sobre la corteza de las glándulas suprarrenales estimulando la síntesis y liberación de los glucocorticoides: en los humanos, cortisol y en los roedores, corticosterona. Los glucocorticoides son hormonas esteroideas que median una enorme cantidad de funciones endocrino-metabólicas y ejercen un rol importante en la regulación del eje HHA, a través de una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, la EM, la hipófisis, e incluso la propia corteza adrenal (Kronenberg and Williams, 2008). Entre los principales efectos de los glucocorticoides se destacan sus acciones sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. A nivel hepático los glucocorticoides estimulan la gluconeogénesis, aumentando los niveles de glucosa en plasma, lo que se denomina efecto hiperglucemiante. En el tejido adiposo estimulan la lipólisis para aumentar la cantidad de ácidos grasos libres, y en el músculo esquelético estimulan la degradación de proteínas, generando sustratos para ser utilizados en la gluconeogénesis. Asimismo, en el músculo esquelético también disminuyen la captación/utilización de glucosa y reducen los depósitos de glucógeno. Los glucocorticoides también tienen efectos sinérgicos con otras hormonas hiperglucemiantes, como las catecolaminas y el glucagón. Además de sus acciones metabólicas, los glucocorticoides también regulan mecanismos relacionados con la

función inmune, la inflamación, el crecimiento, la cognición, la reproducción y el desarrollo pulmonar, entre otros (Wang and Harris).

En el hipotálamo, el NPV se considera uno de los principales centros de control neuroendocrino del cerebro. Se sitúa bilateralmente en la región superior del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior. El NPV se encuentra organizado en distintas subregiones, distinguiéndose principalmente 3 tipos celulares: 1) las células neuroendocrinas magnocelulares, que proyectan sus axones directamente a la hipófisis posterior; 2) las células parvocelulares autonómicas, que proyectan sus axones hacia el tronco encefálico y la medula espinal; y 3) las células neuroendocrinas parvocelulares, que proyectan sus axones hacia la EM liberando sus productos al sistema porta-hipofisario. Estas últimas también pueden denominarse hipofisiotrópicas debido a que regulan la producción de diversas hormonas hipofisarias que controlan una amplia variedad de ejes neuroendocrinos. Los tres tipos de células pueden distinguirse fácilmente en función a sus respectivos tamaños, morfología somática y por su ubicación dentro del NPV. De esta manera, las células neuroendocrinas magnocelulares tienen somas grandes y se concentran en la región lateral del NPV, mientras que las parvocelulares tienden a ser más pequeñas y localizarse en la región medial o compacta del núcleo.

Las neuronas CRF se encuentran enriquecidas en la división neuroendocrina parvocelular del NPV (Biag et al., 2012). El CRF es un péptido hipotalámico de 41 aminoácidos que proviene del clivaje de una preprohormona de 196 aminoácidos y es el principal secretagogo fisiológico de la ACTH (Vale et al., 1981). Por otro lado, el CRF también se produce en otras áreas extra-hipotalámicas como la amígdala, el hipocampo y la corteza (Swanson et al., 1983) que no pertenecen al eje HHA y se relacionan con efectos sobre el comportamiento y la ansiedad (Gallagher et al., 2008, De Francesco et al., 2015). El CRF producido en las neuronas hipofisiotrópicas del NPV se encuentra confinado en gránulos secretorios localizados en las terminales axonales que se ubican en la zona externa de la EM. La activación del eje HHA causa una rápida afluencia de calcio que estimula la fusión de estos gránulos con la membrana plasmática y la posterior liberación del CRF en la vasculatura del sistema porta-hipofisario. De forma simultánea, la activación de estas neuronas también induce la transcripción del gen de CRF seguida de la síntesis peptídica *de novo*. Por lo tanto, mientras que la secreción de CRF permite una rápida activación del eje HHA y la liberación de glucocorticoides, la síntesis *de novo* en el NPV ayuda a reponer su almacenamiento y así mantener la capacidad de respuesta del sistema (Watts, 2005). Existen dos tipos de receptores para CRF (CRF-R) que difieren entre sí por su distribución anatómica y perfil farmacológico: el receptor tipo 1 (CRF-R1) y el receptor tipo 2 (CRF-R2). Ambos receptores son miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G y se expresan en varios núcleos cerebrales (Gallagher et al., 2008), sin embargo, el CRF-R1 es el principal inductor del eje HHA en las células corticotropas de la hipófisis anterior.

Las neuronas CRF hipofisiotrópicas están controladas por una compleja red neuronal que utiliza múltiples transmisores y moduladores peptidérgicos para transmitir información desde varios sitios del cerebro hacia el NPV. Entre los moduladores más importantes que controlan y regulan la actividad de las neuronas CRF se encuentran el GABA, el glutamato, el NPY, el AgRP, la α -MSH, las catecolaminas y la serotonina. El GABA y el glutamato son dos de los principales neurotransmisores que controlan la actividad

de las neuronas CRF (Herman et al., 2002). Las inervaciones GABAérgicas constituyen aproximadamente la mitad de todas las inervaciones del NPV y generan un importante tono inhibitorio sobre las neuronas CRF, el cual prevalece sobre el tono estimulatorio (Park et al., 2007, Ulrich-Lai and Herman, 2009). Las inervaciones GABAérgicas provienen de numerosos núcleos extra-hipotalámicos así como también de varios núcleos hipotalámicos entre los que se encuentra principalmente el ARC (Herman et al., 2003). El efecto inhibitorio de GABA sobre las neuronas CRF está mediado principalmente por los receptores GABA-A, cuyas subunidades se expresan en casi todas las neuronas CRF del NPV (Cullinan, 2000). Las neuronas CRF hipofisiotrópicas también se encuentran densamente inervadas por fibras glutamatérgicas (Wittmann et al., 2005). Si bien algunas evidencias sugieren que el glutamato puede activar directamente a estas neuronas, el principal rol de las inervaciones glutamatérgicas sería la de regular negativamente a las neuronas CRF a través de la activación del tono GABAérgico local (Boudaba et al., 1997, Bartanusz et al., 2004). Las neuronas NPY/AgRP y POMC del ARC también controlan a las neuronas CRF del NPV con el fin de modular el metabolismo energético dependiendo del estado nutricional detectado (Liposits et al., 1988, Li et al., 2000, Kuperman et al., 2016) (**Figura 2**). Diversos estudios han mostrado que la administración de NPY y AgRP en roedores inducen la liberación de CRF y la activación del eje HHA (Smith and Vale, 2006). De los 6 subtipos de receptores para NPY antes descritos, las neuronas CRF expresan solo el receptor Y1 (Dimitrov et al., 2007). Al igual que para NPY y AgRP, el péptido α -MSH derivado de POMC estimula el eje HHA actuando a través del receptor MC4R expresado en estas neuronas. En base a esto, se ha demostrado que la administración de agonistas de MC4R estimula la expresión de CRF y la activación del eje HHA (Lu et al., 2003). Adicionalmente, AgRP funciona como un antagonista endógeno del receptor MC4R ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la acción de α -MSH sobre estas neuronas (Rossi et al., 1998). En síntesis, el eje HHA se puede activar en respuesta a estados de balance energético negativos como positivos.

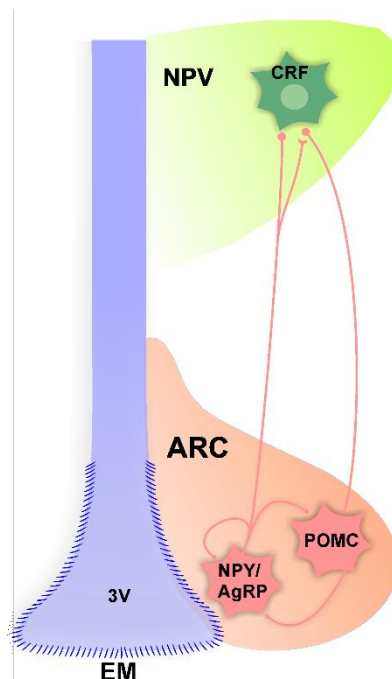


Figura 2: Dibujo esquemático de la disposición relativa del ARC y el NPV con las principales poblaciones neuronales presentes en ellos. Las abreviaturas indican: 3V: tercer ventrículo; ARC Núcleo Arcuato; NPV Núcleo paraventricular; EM eminencia media.

4. Sistema ghrelina/GHSR

Ghrelina

La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos esterificada con un ácido n-octanoico producida principalmente en el estómago (Kojima et al., 1999) que desempeña un papel fundamental en el control de la liberación de hormona de crecimiento (GH, de sus siglas en inglés para *growth hormone*) y la homeostasis energética (Kojima and Kangawa, 2005).

La ghrelina se sintetiza principalmente en las células oxínticas de la mucosa gástrica, específicamente en las denominadas tipo X/A (Date et al., 2000). Casi el 60-70% de la ghrelina circulante es secretada por el estómago, y la mayor parte del resto proviene del intestino delgado (Sakata et al., 2002). Por otra parte, la mayor parte de las evidencias disponibles sugiere que la ghrelina no se produce en el cerebro en niveles fisiológicamente relevantes (Sakata et al., 2009, Furness et al., 2011, Cabral et al., 2017b).

La ghrelina se sintetiza como preproghrelina, un péptido de 117 aminoácidos, que contiene un péptido señal y un péptido de 94 aminoácidos denominado proghrelina, (Kojima et al., 1999, Tanaka et al., 2001). Este pro-péptido es posteriormente esterificado con un grupo n-octanoico en el residuo de serina 3 por la GOAT (de sus siglas en inglés para *Ghrelin O-AcylTransferase*), una enzima localizada en el retículo endoplasmático que utiliza como sustrato los ácidos grasos de la dieta (Kojima and Kangawa, 2005, Yang et al., 2008). Posteriormente, la proghrelina octanoilada es transportada al aparato de Golgi y clivada por la enzima prohormona convertasa 1/3 para generar la ghrelina, a partir del extremo N-terminal, y la obestatina a partir del extremo C-terminal (Zhu et al., 2006, Takahashi et al., 2009). Esto convierte a la ghrelina en la única hormona acilada conocida a la fecha en la cual tanto el grupo n-octanoilo como los primeros 5 aminoácidos en el extremo N-terminal resultan fundamentales para la unión a su receptor y por lo tanto para desencadenar sus acciones biológicas (Muller et al., 2015).

El nivel de ghrelina en plasma se encuentra fuertemente influenciado por el balance energético. De esta manera, el nivel de ghrelina circulante se duplica en antelación a las comidas y disminuye alrededor de una hora después de las mismas (Tolle et al., 2002, Cummings, 2006). La disminución post-prandial del nivel de ghrelina es proporcional a la carga calórica consumida y depende de la composición de los alimentos ingeridos (Muller et al., 2015). Además, el estado nutricional es un importante regulador de estos niveles (Cummings, 2006, Yin et al., 2009), observándose un incremento en situaciones de déficit energético, como puede ser un ayuno, una restricción calórica, la caquexia inducida por cáncer, la anorexia nerviosa, entre otros (Ariyasu et al., 2001, Shimizu et al., 2003, Goldstein et al., 2011, Schalla and Stengel, 2018). La vida media de la ghrelina en plasma varía entre 8 y 10 minutos debido a su rápida des-acilación por esterasas plasmáticas (De Vriese et al., 2004). Asimismo, es importante destacar que la ghrelina circula unida a lipoproteínas y albúmina sérica plasmáticas (De Vriese et al., 2007, Lufano et al., 2016) agregando otro nivel de complejidad a la regulación de la actividad biológica de la misma.

Desacil-ghrelina

La ghrelina también puede secretarse como una versión des-octanoilada, denominada desacil-ghrelina (DAG). Además, como mencionamos anteriormente, la ghrelina sufre una des-octanoilización por esterasas plasmáticas, por lo que la DAG representa el 90% del total de la ghrelina circulante (Patterson et al., 2005). Por ejemplo, la relación ghrelina:DAG en ratones va desde aproximadamente 2,5 en extractos de estómago hasta aproximadamente 0,4 en plasma (Hassouna et al., 2014).

Pese a que inicialmente la DAG fue considerada como un producto de degradación sin actividad biológica (Kojima et al., 1999), actualmente existen evidencias que sugieren que este péptido tiene efectos independientes de la propia ghrelina. Por ejemplo, algunos trabajos han mostrado que la DAG afecta la ingesta de alimentos, el vaciado gástrico, la regulación de la temperatura corporal, el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Asakawa et al., 2005, Inoue et al., 2013, Heppner et al., 2014). Se ha mostrado que la DAG no compite con ghrelina por la unión a GHSR en concentraciones fisiológicas (Veldhuis and Bowers, 2010), sin embargo, la DAG puede activar el GHSR en concentraciones suprafisiológicas (Gauna et al., 2007, Heppner et al., 2014). Dado que la DAG es la forma más abundante en circulación, también se ha sugerido la existencia de un receptor específico debido a que algunos de los efectos de esta hormona ocurren en animales deficientes de GHSR (Toshinai et al., 2006). Algunos estudios han mostrado mediante ensayos de unión que la DAG se une a diferentes tipos de células, incluidos los cardiomiocitos (Lear et al., 2010), las células progenitoras endoteliales (Togliatto et al., 2010) y las neuronas de la médula espinal de ratas fetales (Sato et al., 2006), entre otros. Sin embargo, hasta ahora no se ha publicado la existencia de tal receptor y, en consecuencia, sigue siendo un tema de debate si la DAG debe ser considerada como una hormona.

Receptor de ghrelina

El receptor de ghrelina, conocido como GHSR (de sus siglas en inglés para *Growth Hormone Secretagogue Receptor*) es un receptor acoplado a proteína G que se expresa predominantemente a nivel central, tanto en la hipófisis anterior como en el hipotálamo. Dentro del hipotálamo, se expresa principalmente en el ARC, localizándose en las neuronas liberadoras de hormona de crecimiento (GHRH) relacionadas con la producción de GH, y en las neuronas NPY/AgRP, relacionadas al control del apetito y el balance energético (Howard et al., 1996, Guan et al., 1997, Zigman et al., 2006) (**Figura 3**). La ghrelina, tras unirse a GHSR, activa transcripcional y eléctricamente a las neuronas hipotalámicas por mecanismos post-sinápticos, sin embargo, también se ha descrito la presencia de GHSR en terminales pre-sinápticas en donde se desconoce si contribuye a dicha activación neuronal (Cowley et al., 2003, Cabral et al., 2016)

Existen dos variantes del receptor generadas por empalme alternativo del ARNm, denominadas GHSR-1a y -1b. El GHSR-1a es una proteína de 366 aminoácidos con 7 dominios transmembrana (7TM); mientras que GHSR1b es una proteína de 289 aminoácidos con 5 dominios transmembrana (5TM) (Howard et al., 1996). En la actualidad, se conoce que la forma -1a del receptor es la única forma a la que se une y a través de la cual actúa la ghrelina, por lo tanto, de aquí en adelante, al hablar de GHSR se estará haciendo referencia a la variante GHSR-1a.

La señalización intracelular de los receptores de 7TM requiere de un cambio conformacional en el cual el receptor pasa de un estado inactivo a uno activo y, en la mayoría de los casos, este proceso se facilita por la unión de un agonista (Gether et al., 1995). Sin embargo, existen ciertos receptores 7TM que se estabilizan en una conformación activa y señalizan aún en ausencia de su ligando, lo que se conoce como actividad constitutiva. La actividad constitutiva se describe para varios receptores acoplados a proteína G; sin embargo, el nivel de actividad encontrado es muy bajo para la mayor parte de ellos (Arvanitakis et al., 1998; Smit et al., 2007). El GHSR es una de las excepciones, ya que presenta una elevada actividad en ausencia del ligando, la cual alcanza el 50% de su capacidad máxima en presencia de ghrelina (Holst et al., 2003). De este modo, el GHSR es, hasta la fecha, el receptor 7TM conocido con mayor actividad constitutiva. Estudios recientes han mostrado que GHSR presenta varias vías de señalización intracelular (Sivertsen et al., 2013), entre las que pueden destacarse el acoplamiento a la proteína Gq y Gi/o desencadenando cascadas de señalización intracelulares diferentes si la actividad es evocada por ghrelina o constitutiva, respectivamente (Camina et al., 2007, Damian et al., 2012, Mary et al., 2012, Lopez Soto et al., 2015). La actividad constitutiva de GHSR ha sido principalmente estudiada en sistemas *in vitro*, centrándose en los aspectos moleculares de la misma (Mear et al., 2013). Sin embargo, algunos trabajos apoyan la idea de que la actividad constitutiva de GHSR también tendría relevancia fisiológica. Para estudiar *in vivo* la actividad constitutiva de GHSR se han realizado estudios en roedores utilizando drogas que reducen esta actividad, denominadas agonistas inversos. Estos estudios mostraron una reducción en la ingesta de alimentos y el peso corporal luego del tratamiento (Petersen et al., 2009, Els et al., 2012, Abegg et al., 2017). Adicionalmente, se han reportado en humanos mutaciones específicas en el gen de GHSR que suprimen selectivamente la actividad constitutiva sin alterar la actividad evocada por ghrelina, las cuales fueron asociadas a un fenotipo de baja estatura familiar (Pantel et al., 2006, Inoue et al., 2011). En conclusión, estos hallazgos sugieren que la actividad constitutiva del GHSR tendría un rol *in vivo* afectando tanto la secreción de GH, como la regulación de la ingesta de alimentos y el peso corporal. Por otro lado, es importante mencionar que el GHSR también es capaz de dimerizar con otros receptores acoplados a proteínas G como el receptor de serotonina 5c, el MC3R y los receptores de dopamina D1 y D2 (Wellman and Abizaïd, 2015). Por lo tanto, la actividad de GHSR independiente de la ghrelina también ejerce un rol modulador de las vías de señalización de otros receptores teniendo particular importancia en los núcleos cerebrales en los que la ghrelina tiene una accesibilidad limitada.

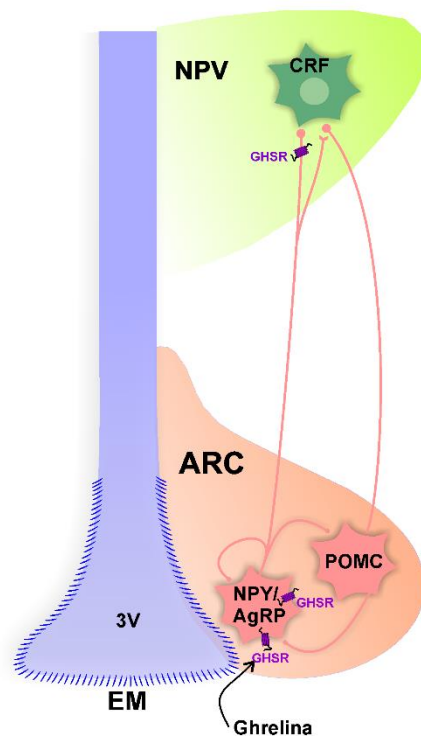


Figura 3: Dibujo esquemático de la disposición relativa del ARC y el NPV con las principales poblaciones neuronales que expresan GHSR. Las abreviaturas indican: 3V: tercer ventrículo; ARC Núcleo Arcuato; NPV Núcleo paraventricular; EM eminencia media; GHSR: Receptor de ghrelina.

5. Funciones principales del sistema ghrelina/GHSR en el hipotálamo

El sistema ghrelina/GHSR regula una gran variedad de funciones fisiológicas que se encuentran orquestadas por circuitos neuronales específicos y/o por células específicas de la hipófisis anterior (Zigman et al., 2006, Mani et al., 2014, Muller et al., 2015). Numerosos estudios han evaluado el efecto del sistema ghrelina/GHSR sobre la secreción de GH (Takaya et al., 2000), la ingesta de alimentos (Kojima and Kangawa, 2005, Andrews, 2011), el peso corporal (Wren et al., 2001), el metabolismo de la glucosa (Muller et al., 2015) y las respuestas neuroendocrinas relacionadas al estrés que incluyen la activación del eje HHA a nivel hipotalámico (Spencer et al., 2015, Cabral et al., 2016).

Acciones orexigenicas

La ghrelina es la única hormona peptídica conocida a la fecha capaz de estimular la ingesta de alimento, ejerciendo sus acciones principalmente en las neuronas NPY/AgRP del ARC (Nakazato et al., 2001, Kohno et al., 2003, Mason et al., 2014). Los efectos orexigénicos de la ghrelina tienen un inicio inmediato, con un aumento de la ingesta a los 5-10 min después de su administración sistémica (Cummings, 2006). Al unirse a su receptor, la ghrelina activa a las neuronas NPY/AgRP, las cuales a su vez, activan el NPV a través de la liberación directa de NPY sobre estas neuronas y a través del efecto inhibitorio que produce AgRP sobre los péptidos anorexigénicos derivados de POMC sobre este núcleo. Además, y dado que las neuronas POMC no expresan GHSR (Willesen et al., 1999), la ghrelina inhibiría indirectamente estas neuronas vía un aumento de las corrientes post-sinápticas inhibitorias GABA

dependientes de las neuronas NPY/AgRP, potenciando de esta manera su efecto orexigénico (Cowley et al., 2003, Tong et al., 2008). Como se ha comentado previamente, la ghrelina podría acceder fácilmente al ARC debido a la proximidad de este núcleo hipotalámico con los capilares fenestrados de la EM (Ciofi et al., 2009, Cabral et al., 2014, Cabral et al., 2015). El papel clave del ARC en las acciones orexigénicas de la ghrelina plasmática se ha mostrado en ratones con el ARC-lesionado, los cuales no aumentan la ingesta de alimentos en respuesta a la administración de ghrelina sistémica pero sí responden ante administraciones centrales de la hormona (Cabral et al., 2014).

La relevancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR se hace más evidente en situaciones de déficit energético, como el ayuno o la restricción calórica, cuando el sistema se encuentra estimulado y activa respuestas que contribuyen principalmente a mantener la glucemia y a impulsar la ingesta de alimentos (Goldstein et al., 2011). Como se ha mencionado antes, el nivel de ghrelina y DAG en plasma aumentan durante el ayuno tanto en humanos como en roedores (Ariyasu et al., 2001, Zhao et al., 2010, Steyn et al., 2012), y, además, el ARNm de GHSR también aumenta en extractos de hipotálamo de roedores ayunados (Kim et al., 2003, Luque et al., 2007, Henry et al., 2015). Particularmente, la señalización de GHSR parece ser más relevante durante el ayuno prolongado, en comparación con los períodos de ayuno cortos, a pesar de que los niveles de ghrelina sean similares en ayunos de 24 y 48 hs (Luque et al., 2007, Cabral et al., 2017a). En condiciones de ayuno, las neuronas NPY/AgRP del ARC se activan y las neuronas POMC se inhiben (Takahashi and Cone, 2005, Perello et al., 2007, Atasoy et al., 2012), impulsando una hiperfagia compensatoria que ocurre si los animales ayunados tienen acceso a comida (Segal-Lieberman et al., 2003, Luque et al., 2007). Por lo tanto, la acción del sistema ghrelina/GHSR sobre el ARC es fundamental en la regulación del balance energético.

Acciones sobre el eje HHA

La ghrelina estimula el eje HHA tanto en humanos como en roedores. En personas sanas, la administración de ghrelina aumenta las concentraciones plasmáticas de ACTH y cortisol en forma dependiente de la dosis de ghrelina administrada (Arvat et al., 2001). En ratones, la ghrelina también aumenta los niveles de glucocorticoides en el plasma a través de la activación de las neuronas CRF del NPV (Cabral et al., 2012). Las neuronas CRF no expresan el GHSR y se ha propuesto que la ghrelina actúa a nivel pre-sináptico activando el eje HHA a través de la inhibición del tono GABAérgico que inerva a las neuronas CRF, lo que lleva a la activación de estas neuronas y a un concomitante aumento de los niveles plasmáticos de glucocorticoides (Cabral et al., 2012, Cabral et al., 2014, Cabral et al., 2016). Estos estudios también han mostrado que la activación de las neuronas CRF inducida por la ghrelina exógena ocurre de manera independiente del ARC, a pesar de la fuerte inervación que tiene este núcleo sobre el NPV. Por lo tanto, la ghrelina parece regular las respuestas orexigénicas y las respuestas relacionadas al estrés a través de circuitos neuronales independientes. El aumento de los glucocorticoides inducido por la ghrelina sería uno de los principales mecanismos, junto con la secreción de GH, a través de los cuales esta hormona ayudaría a mantener transitoriamente la homeostasis de la glucemia.

6. Control de la homeostasis energética en situaciones de déficit energético

Ante una situación de balance energético negativo, en donde la ingesta de alimentos resulta insuficiente para mantener el gasto energético del organismo, resulta fundamental un control adecuado de la homeostasis energética para preservar principalmente los niveles de glucosa en sangre y asegurar la supervivencia. Cuando el organismo censa una situación de déficit energético activa en primer lugar una serie de mecanismos de adaptación que mantienen el suministro de energía a partir de las reservas energéticas del organismo. La respuesta inicial ante estas situaciones es la liberación de glucosa del hígado y los músculos esqueléticos. Una vez que las reservas de glucógeno se agotan, se entra en una segunda fase caracterizada por la liberación de ácidos grasos de las reservas de tejido adiposo, los cuales son utilizados como sustrato para la gluconeogénesis hepática. Además de proporcionar la energía necesaria para la gluconeogénesis en el hígado, los ácidos grasos también se utilizan en la producción de cuerpos cetónicos que sirven como sustrato energético en el SNC y los músculos esqueléticos. Todos estos procesos se encuentran orquestados por hormonas, principalmente a través de la caída de la insulina, el aumento del glucagón y el aumento de GH, entre otras (Cahill, 2006). Estos mecanismos, en conjunto, aseguran la supervivencia en periodos breves de privación de alimentos, sin embargo, en situaciones de déficit energético más severas, las reservas lipídicas se agotan y ocurre una caída abrupta de la glucosa en sangre. Esta situación es censada por los principales circuitos neuronales del SNC encargados de la regulación del balance energético, como el núcleo ARC, que desencadena respuestas dinámicas y reversibles, generando un importante poder de adaptación a los cambios energéticos. Estos circuitos activan una serie de mecanismos homeostáticos que promueven el consumo de alimento y, simultáneamente y hasta que eso se efectivice, activa mecanismos tendientes a reducir el gasto energético y mantener el metabolismo basal para, de esta manera, mantener la glucemia estable. Adicionalmente, en estas condiciones, ocurre un importante aumento de la señalización del sistema ghrelina/GHSR que interviene a nivel hipotalámico e hipofisario, estimulando la ingesta de alimentos, la liberación de GH y la secreción de glucocorticoides que contribuyen en conjunto, al mantenimiento de la glucosa en sangre. Si bien los diferentes mecanismos de respuesta adaptativa ante un déficit energético ya han sido previamente estudiados, los mecanismos a través de los cuales el sistema ghrelina/GHSR actúa en situaciones de déficit energético y su integración con otros sistemas y/o circuitos neuronales son aún desconocidos.

Las situaciones de balance energético negativo pueden implicar desde un ayuno o una restricción calórica (forzados o voluntarios) hasta situaciones patológicas como la caquexia inducida por cáncer o trastornos de la alimentación como la anorexia nerviosa, bulimia, entre otros. Todas estas situaciones cursan con una fisiopatología distinta, pero en todas ellas hay un aumento de los valores de ghrelina en plasma y una pérdida progresiva de peso corporal. Por ejemplo, varios estudios reportan que los pacientes con anorexia nerviosa poseen altos niveles de ghrelina en plasma, que se normalizan después de la ingesta o la recuperación del peso corporal (Ogiso et al., 2011). De igual forma, algunos estudios muestran aumentos en los niveles de ghrelina en los pacientes con caquexia inducida por cáncer, aunque las evidencias en este caso parecen no ser concluyentes (Blauwhoff-Buskermolen et al., 2017). Por otro lado, las personas en déficit energético, incluyendo los pacientes con trastornos de la conducta alimentaria, se caracterizan por mostrar una hiperactividad del eje HHA con anomalías en su regulación que llevan a

niveles basales de CRF y cortisol elevados (Castellini et al., 2014). Dada la gravedad de las cifras crecientes de pacientes con diferentes trastornos asociados a situaciones de balance energético negativo, resultarían sumamente relevantes los estudios que colaboren con el entendimiento de estas patologías para poder contribuir al desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas para el tratamiento de las mismas.

Debido a todo lo anteriormente expuesto, en la presente Tesis Doctoral se utilizó un modelo experimental de ayuno de 48 hs para estudiar los diferentes aspectos neuroanatómicos y neuroendocrinos que se asocian a situaciones de balance energético negativo severas. La utilización de este modelo experimental nos permitió reproducir las características más importantes asociadas a una situación de balance energético negativo debido a que tanto los niveles de ghrelina en plasma como los niveles de GHSR hipotalámico, los niveles de NPY y la actividad del eje HHA se encuentran elevados. Sin embargo, el funcionamiento y la relevancia de estos circuitos hipotalámicos en relación al sistema ghrelina/GHSR no ha sido estudiado previamente. Por este motivo, en este trabajo de Tesis doctoral se investigó la hipótesis de que *los cambios en la señalización del sistema ghrelina/GHSR inducido por ayuno son capaces de modular la magnitud de un evento hiperfágico compensatorio y la respuesta de las neuronas CRF del NPV*. Por otro lado, nuestra hipótesis de trabajo indica que cambios en la señalización del sistema ghrelina/GHSR inducido por ayuno controlan los cambios en las inervaciones del ARC al NPV y que esto afecta la respuesta de las neuronas CRF y el eje HHA. Además y debido a que durante un ayuno, los niveles de DAG también se encuentran incrementados, estudiamos si este péptido es capaz de actuar en el cerebro e intervenir en la señalización del sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico.

De ésta manera, esperamos que el desarrollo de ésta Tesis Doctoral pueda aportar información y esclarecer el aún desconocido mecanismo por el cual el sistema ghrelina/GHSR modula los circuitos hipotalámicos que controlan el balance energético.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral es estudiar el rol modulador del sistema ghrelina/GHSR en los circuitos neuronales hipotalámicos involucrados en la regulación del apetito y la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en una condición de ayuno.

A continuación, indicamos en forma independiente los objetivos específicos que se abordaron utilizando ratones como modelo experimental.

Objetivos específicos:

Objetivo 1: Estudiar el rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la hiperfagia compensatoria inducida por ayuno. Bajo un protocolo de ayuno realimentación:

- a- Caracterizar los patrones de consumo de alimento que ocurren luego de un evento de ayuno.
- b- Determinar si ocurren cambios en el sistema ghrelina/GHSR
- c- Determinar si ocurren cambios en la producción de neuropéptidos del ARC.
- d- Estudiar si cambios en la magnitud de la hiperfagia compensatoria dependen de la señalización del sistema ghrelina/GHSR.

Objetivo 2: Estudiar el rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en una condición de ayuno.

- a- Determinar si las neuronas CRF hipofisiotrópicas se activan en una condición de ayuno.
- b- Determinar si ocurren cambios en las inervaciones del NPV en una condición de ayuno.
- c- Determinar si la activación de las neuronas CRF requiere la integridad del ARC.
- d- Determinar si la activación de las neuronas CRF y los cambios en las aferencias al NPV dependen de la señalización del sistema ghrelina/GHSR.

Objetivo 3: Estudiar el rol de la DAG sobre el sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico.

- a- Determinar qué núcleos hipotalámicos son accesibles y cuales se activan en respuesta a la administración central de la DAG.
- b- Determinar si la administración central de la DAG puede modular la señalización del sistema ghrelina/GHSR.
- c- Estudiar la bioactividad de la DAG mediante la evaluación del efecto orexigénico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales Experimentales

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron ratones machos adultos (12-16 semanas de edad) generados en el bioterio del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, La Plata, Buenos Aires, Argentina) o en el Centro de Psiquiatría y Neurociencias (Paris, Francia). Se mantuvieron a los animales en cuartos con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (luz de 7:00 a 19:00 hs y oscuridad de 19:00 a 7:00 hs), a temperatura constante (22 ± 1 °C) con libre acceso a agua y alimento, excepto cuando se indica lo contrario. Se utilizó una dieta balanceada comercial para ratón que contiene un 4% de contenido graso (Gepsa SA). En este estudio se utilizaron ratones de las siguientes cepas:

-Ratones salvajes (*wild type*, WT), de la cepa C57BL/6.

-Ratones deficientes de GHSR (GHSR(-/-)), en los cuales la expresión de GHSR se encuentra bloqueada por la inserción de un *cassette* de bloqueo de la transcripción (TBC, de sus siglas en inglés para *Transcription Blocking Cassette*) insertado entre el primer y el segundo exón del gen. El *cassette* se encuentra localizado entre dos sitios loxP, que son reconocidos por la recombinasa Cre para su escisión. Se utilizaron animales homocigotas que se obtuvieron por la cruce entre animales heterocigotas con una base genética C57BL/6. Estos animales fueron generados por el grupo del Dr. Zigman de la Universidad de Texas Southwestern Medical Center (Zigman et al., 2005).

-Ratones *knock-out* (KO) para ghrelina (ghrelina-KO), los cuales no expresan el gen de ghrelina debido a la presencia de una delección de la secuencia codificante para la ghrelina, que abarca los exones 2 y 3. Se utilizaron animales homocigotas que se obtuvieron por la cruce entre animales heterocigotas con una base genética C57BL/6. Estos animales fueron generados por el grupo de la Dra. Tolle del Centro de Psiquiatría y Neurociencias (Paris, Francia) (Hassouna et al., 2014).

-Ratones NPY-GFP, los cuales expresan la proteína fluorescente verde (GFP, de sus siglas en inglés para *Green Fluorescent Protein*) bajo el control del promotor de NPY. Estos animales fueron comercialmente provistos por *Jackson Laboratories* (NPY-GFP #Stock 006417) (van den Pol et al., 2009).

-Ratones GHSR(-)/NPY-GFP, los cuales tienen bloqueada la expresión de GHSR y, al mismo tiempo, expresan la proteína GFP bajo el control del promotor NPY. Estos ratones se generaron mediante la cruce de ratones GHSR(-/-) y ratones NPY-GFP.

-Ratones WT con el ARC-lesionado, los cuales presentan una lesión neurotóxica en el núcleo ARC. Estos ratones se generaron a través de la administración por vía subcutánea de una dosis de 2,5 mg/g de peso corporal de glutamato monosódico (de aquí en adelante ARC-lesionado) o una solución al 10% de NaCl estéril (de aquí en adelante ARC-intacto) a ratones WT macho de cuatro días de vida (P4).

Los diferentes grupos experimentales se alojaron en jaulas colectivas, con no más de 5 animales por jaula, hasta una semana antes del experimento correspondiente, cuando se transfirieron a jaulas individuales.

Todos los estudios se llevaron a cabo bajo las estrictas exigencias éticas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio. Todos los protocolos experimentales recibieron aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de cada Instituto.

2. Reactivos

- 3-3'-diaminobenzidina (DAB)/Solución de Níquel (Sigma Aldrich, cat # 32750).
- Ácido p-hidroximercuribenzoico, inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, cat. 12425).
- Alcoholes (Biopack).
- Anticuerpo anti-NPY generado en conejo (Abcam, cat # AB-30914).
- Anticuerpo anti-c-Fos generado en conejo (Santa Cruz, cat # SC-7202).
- Anticuerpo anti-POMC generado en conejo (Phoenix Pharmaceuticals, cat # H-029-30).
- Anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a Alexa 488 generado en cabra (Molecular Probes, cat # A-11096).
- Anticuerpo anti-fluoresceína generado en cabra (Molecular Probes, cat # A-11095).
- Anticuerpo anti-CRF generado en conejo provisto por la Profesora Dra. María Castro de la Universidad de Michigan.
- Anticuerpo anti-AgRP generado en conejo (Phoenix Pharmaceuticals, cat # H-003-57).
- Anticuerpo anti-vimentina generado en gallina (Millipore, cat # AB-5733).
- Anticuerpo anti-conejo biotinilado (Vector Laboratories, cat # BA-1000).
- Anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa 594 (Invitrogen A21207 lote 52958A).
- Anticuerpo anti-cabra biotinilado (Vector Laboratories, cat # BA-5000).
- Anticuerpo anti-gallina conjugado a Alexa 594 (Abcam, cat # ab150176).
- Bálsamo de Canadá (Biopack).
- Buffer fosfato-salina (PBS, del inglés, phosphate buffered saline) 0,01 M pH 7,4: Na_2HPO_4 1,9 g/L, NaH_2PO_4 0,32 g/L y NaCl 8,16 g/L (Biopack).
- Colchicina (Sigma-Aldrich, C2580000).
- DABCO (Sigma, lote 95H3458).
- DAG marcada con fluoresceína (F-DAG) (sintetizada por el laboratorio del Dr. Luyt del Departamento de Química de la Universidad de Western Ontario, Canadá).
- Dietil-pirocarbonato (Sigma, cat # D5758).
- dNTPs (Invitrogen, cat # 10297018).
- D-Lys-GHRP-6 (Sigma, cat # G4535).

- EDTA.
- Formaldehído (Biopack).
- Flunixin meglumina (Flumeg, Over).
- GelRed (Biotium, cat # 41001-41003-T).
- Ghrelina esterificada con ácido n-octanoico (Global Peptide, cat # PI-G-03).
- Ghrelina marcada con fluoresceína (F-ghrelina) (Sintetizada por el laboratorio del Dr. Luyt del Departamento de Química de la Universidad de Western Ontario, Canadá).
- Glucosa (Biopack).
- Heparina (Calciparine, Sanofi Aventis).
- HOT FIREPol Eva Green Master Mix (Solis BioDyne).
- Kw(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ (Sintetizada por el Dr. Marie, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier).
- Ketamina (Holliday Scott SA).
- Kit comercial de complejo avidina-biotina-peroxidasa "VectaStain Elite ABC" (Vector Laboratories, cat # PK-6200).
- Kit de Inmunoensayo enzimático para DAG, rata/ratón (Bertin Pharma, cat # A05118).
- Kit de Inmunoensayo enzimático para ghrelina, rata/ratón (Bertin Pharma, cat # A05117).
- Kit "Glicemia enzimática" para la determinación de glucosa en plasma (Wiener Argentina, cat # 1400101).
- Kit "TG color" para la determinación de triglicéridos en plasma (Wiener Argentina, cat # 1780115).
- RNase Out (Invitrogen, cat # 10777019).
- Sacarosa (Biopack).
- Suero Normal de Burro (Equitech-Bio.INC lote SD 30-2090).
- TAQ Pegasus ADN polimerasa (EmbioTec, cat # EA00101- 500 U).
- Transcriptasa reversa M-MLV (Promega, cat # 9PIM170).
- Tritón-X100 (Biopack).
- TRIzol (Invitrogen, cat # 15596018).
- Xilacina (Richmond Vet Pharma).

3. Genotipificación de los animales

Al momento del destete (21 días post-nacimiento, P21), las crías fueron numeradas con marcas en las orejas. Al mismo tiempo, se cortó un segmento de ~2 mm del extremo de la cola que luego se procesó para extraer el ADN para su genotipificación. Cada fragmento de cola se recogió en un tubo Eppendorf de 200 µL y se extrajo el ADN mediante incubación en 75 µL de una mezcla de NaOH 25 mM con EDTA 0,2 mM durante 1 hora a 98°C. Luego de 1 hora, la mezcla se enfrió a 15°C, se agregó 75 µL de Tris-HCl (pH 5,5) y se homogeneizó. Esta mezcla se puede emplear inmediatamente para realizar el genotipado o se puede conservar a -20°C hasta su procesamiento. Para la genotipificación se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés para *Polymerase Chain Reaction*). La mezcla de reacción consta de: 1,25 µL de buffer 10X; 0,625 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,25 µL de dNTPs 10 mM; 0,0625 µL de TAQ Pegasus ADN polimerasa 5 U/µL; 0,625 µL de primer forward 10 µM; 0,625 µL de primer reverse 10 µM; 1 µL de la mezcla de extracción del ADN y 12,5 µL de H₂O MQ. Los primers *forward* y *reverse* utilizados para cada genotipo de ratón se detallan en la **Tabla 1**. La mezcla se cicló durante 2 hs en un termociclador (Bio-Rad) con el siguiente protocolo: 4 min a 94°C; 35 ciclos de: 30s a 94°C, 30s a 59°C y 45s a 72°C; 7min a 72°C y finalmente se sostuvo a 10°C. Una vez terminado el ciclado, se agregó a cada tubo 2,1 µL de una mezcla de buffer de carga con un colorante de ácidos nucleicos (GelRed) y se homogeneizó. Se sembró 6 µL de esta mezcla en un gel de agarosa al 2% y se corrió en una cuba electroforética durante 1 hora a 90V. El gel se reveló en un transiluminador UV (Gel-Doc XR+, Bio-Rad) y se acuerdo al patrón de bandas observado, se determinó el genotipo de cada animal.

Cepa de ratón	Gen	Alelo	Primers	Producto
GHSR (-/-)	ghsr	WT	Fwd: 5'-GAGTGACAGGTAAGTGAGTGCG-3' Rev: 5'-GTGCGAACATTAGAGATGAAAGG-3'	184pb
		TBC	Fwd: 5'-AAGAGCTACAGGAAGGCAGGTCA -3' Rev: 5'-GTGCGAACATTAGAGATGAAAGG-3'	175pb
NPY-eGFP	eGFP		Fwd: 5'-TATGTGGACGGGGCAGAAGATCCAGG-3' Rev: 5'-AGGTGCGGTTGCCGTAAGTGA-3'	400pb
Ghrelin-KO	preproghrelina	WT	Fwd: 5'-TTCTAGAAGCTTGCTGGATT-3' Rev: 5'-GTTATAAGAACATGCTGGTG-3'	469pb
		KO	Fwd: 5'-TTCTAGAAGCTTGCTGGATT-3' Rev: 5'-GTTATAAGAACATGCTGGTG-3'	150pb

Tabla 1. *Primers* empleados en la genotipificación de las cepas de ratones modificados genéticamente utilizados. Fwd, *forward*; Rev, *reverse*; pb, longitud del amplificado en pares de bases.

4. Cirugías estereotáxicas

Todas las cirugías fueron realizadas en el cuarto de cirugías del bioterio del IMBICE, con material adecuado y en las condiciones de asepsia normalmente requeridas. En todos los casos, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (150 mg/kg de peso IP) y Xilacina (15 mg/kg de peso IP).

Implantación de cánula intra-cerebro-ventricular (ICV). Para esta cirugía, los ratones fueron colocados en un aparato estereotáxico para la fijación de una cánula guía permanente (4mm de largo, calibre 22G, Plastics one) dentro del ventrículo lateral. Previo pelado craneal, se realizó un corte en la piel de la calota y se eliminaron las membranas que recubren el cráneo para poder visualizar el punto de bregma y establecer las coordenadas estereotáxicas del mismo. Una vez establecidas, se utilizaron las coordenadas: -0,34 mm antero-posterior; +1 mm lateral y -2,3 mm ventral, que corresponden al ventrículo lateral derecho según el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Es importante mencionar, que a este nivel antero-posterior, los ventrículos laterales se encuentran conectados al tercer ventrículo, proporcionando un alcance rápido de las moléculas inyectadas ICV a esta zona hipotalámica. En este lugar, se perforó el cráneo, se colocó la cánula guía y se fijó al hueso con acrílico dental. Finalmente se cerró la herida y el extremo libre de la cánula se tapó con un obturador adecuado. Después de la cirugía, los ratones fueron alojados en cajas individuales, y se dejaron recuperar por al menos 5 días tratándolos diariamente con flunixin meglumina (Flumeg 5%) para reducir la inflamación antes de someterlos a los protocolos experimentales. Para minimizar el estrés del día experimental, los animales fueron manipulados diariamente. En todos los casos, la posición final de la cánula fue determinada por observación histológica de los cerebros al finalizar los experimentos.

5. Procedimientos experimentales

5.1. Estudio del rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la hiperfagia compensatoria inducida por ayuno.

5.1.1. Protocolo experimental

El diseño experimental del protocolo de ayuno-realimentación se encuentra diagramado en la **Figura 4**. Los animales WT o modificados genéticamente se expusieron o no a un protocolo de ayuno-realimentación, en el cual se ayunaron retirando el alimento de las cajas a las 10:00 hs y luego se realimentaron o no 48 hs después. El tiempo empleado de ayuno se basó en estudios previos que muestran que un ayuno de 48 hs desencadena respuestas hiperfágicas robustas (Erickson et al., 1996, Pedroso et al., 2016) y presentan un incremento en los niveles del ARNm de GHSR como en la sensibilidad central a la ghrelina (Luque et al., 2007). Los pesos corporales y el consumo de alimento se monitorearon diaria- y manualmente a las 10:00 hs de cada día durante la totalidad del protocolo experimental. Se calculó la ingesta restando al peso de alimento inicial, el peso de alimento remanente a las 10:00 hs del siguiente día, y se expresó como gramos consumidos por día (g/día). En este protocolo se usaron 26 ratones WT: n=9 alimentados y n=17 realimentados; n=11 ratones GHSR(-/-) y n=15 ratones WT hermanos de camada de los GHSR(-/-) realimentados y por último, n=4 ratones ghrelina-KO y n=7 ratones WT hermanos de camada de los ghrelina-KO realimentados.

De manera complementaria, otro grupo de animales WT aclimatados y alojados individualmente en cajas metabólicas se expusieron o no a un protocolo de ayuno-realimentación (*TSE Systems GmbH*). En este caso, el consumo de alimento y la actividad locomotora se monitorearon automáticamente y de forma continua mediante transductores de peso y sensores infrarrojos de movimiento, respectivamente. Respecto a la actividad locomotora, se expresó como el número de veces que el paso del ratón corta los

haces de luz infrarroja que atraviesan la jaula en el eje x-y (interrupciones del haz). En este caso, se usaron n=4 ratones WT alimentados y n=4 ratones WT realimentados.

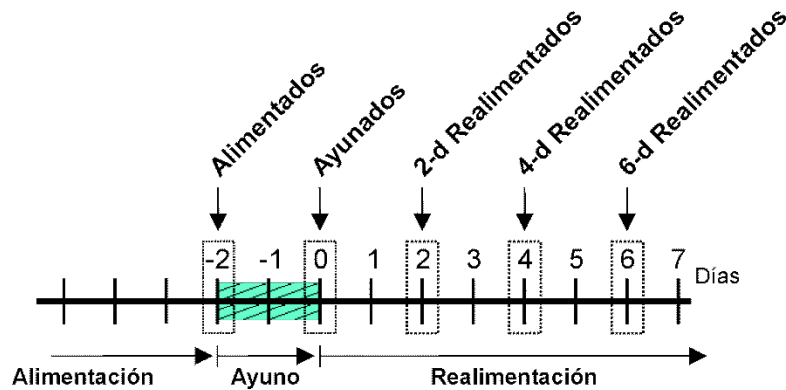


Figura 4: Diseño experimental. La figura resume el diseño experimental usado en esta sección de la Tesis Doctoral. Ratones WT o genéticamente modificados expuestos a un protocolo de ayuno-realimentación fueron estudiados a los diferentes tiempos indicados por flechas sobre la línea de tiempo. También se usaron ratones WT manipulados farmacológicamente con moduladores de la actividad de GHSR durante el periodo de ayuno, indicado en la línea de tiempo como un cuadrado coloreado a rayas.

5.1.2. Determinaciones plasmáticas

En un estudio independiente, animales WT pertenecientes a cada grupo experimental (n=6 por grupo) se sacrificaron por decapitación a las 10:00 hs de cada día para estudiar los niveles plasmáticos de ghrelina, DAG, triglicéridos y glucosa (**Figura 4**). En este caso, las muestras de sangre troncal colectadas se utilizaron para las diferentes medidas en plasma, mientras que los cerebros de estos mismos animales se utilizaron para obtener micro-disecciones de ARC y cuantificar los niveles de ARNm de los genes *pomc*, *npv* y *ghsr* (ver después).

-Determinación de ghrelina y DAG: las muestras colectadas de sangre fueron colocadas en tubos conteniendo EDTA (1mg/ml final) en hielo. Se agregó a cada muestra el inhibidor de proteasas, ácido p-hidroximercuribenzoico, en una concentración final de 0,4 mM. Posteriormente se centrifugó 5 min a 4000 rpm a 4°C, e inmediatamente el plasma obtenido se trató con una décima parte de HCl 1M para preservar la acilación y poder almacenarlos a -80°C hasta su uso. Los niveles de ghrelina y de DAG se determinaron utilizando un kit específico de inmuno-ensayo enzimático (A05118 y A05117, respectivamente, Bertin Pharma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

-Determinación de triglicéridos: se determinó utilizando un reactivo comercial del laboratorio Wiener Argentina. La técnica se basa en la hidrólisis de los triglicéridos por medio de lipasas dando lugar a la formación de glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado a glicerolfosfato en presencia de glicerokinasa y adenosín-trifosfato (ATP), luego este derivado fosforilado es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de glicerol fosfato oxidasa. El producto final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 505 nm. Esta absorbancia resulta directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra.

-Determinación de glucosa: se determinó utilizando un reactivo comercial del laboratorio Wiener

Argentina. La glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Éste último en presencia de peroxidasa oxida al cromógeno 4- aminofenazona/fenol a una quinoneimina de color rojo cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 505 nm y es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra

5.1.3. Determinaciones de ARNm

En primer lugar, los cerebros frescos de los animales previamente decapitados fueron extraídos en un ambiente libre de ARNasas y fueron colocados en una matriz acrílica para realizar cortes de 1 mm de ancho mediante el uso de dos cuchillas. A continuación, los cortes se volcaron en una caja de Petri con una solución de dietilpirocarbonato 0,1% en PBS (inhibidor de proteasas) donde se realizaron micro-disecciones cilíndricas en cada ARC mediante el uso de un micro-colector de tejido de 1 mm de diámetro siguiendo las coordenadas establecidas en el Atlas del cerebro ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Posteriormente, las micro-disecciones del ARC se recogieron en 200 µL de reactivo Trizol™ (Invitrogen) y el ARN total se aisló de acuerdo al protocolo propuesto por el proveedor. Una vez obtenido el ARNm, se utilizaron 500 ng del mismo para obtener ADN complementario (ADNc) mediante retro-transcripción utilizando la enzima Transcriptasa inversa (RT) del Virus de Leucemia Murina de Moloney (Promega), cebadores hexámeros aleatorios y dNTPs, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ciclo umbral (Ct) de cada muestra y la eficiencia de cada reacción de qPCR se calculó usando el programa de análisis Step One Software (Applied Biosystems). La eficiencia de las reacciones de qPCR se evaluó por el método de curva estándar, realizando la amplificación de seis diluciones seriadas de ADNc y posterior construcción de la recta Ct versus log de la dilución (eficiencia=10^(-1/pendiente)-1). Se expresaron los niveles de expresión de las muestras experimentales en cantidades relativas de cada grupo experimental respecto al grupo control alimentado, normalizando la expresión al gen de la proteína ribosomal L19 (gen de referencia). La secuencia de *primers* y productos obtenidos se encuentran en la **Tabla 2**.

Gen	Primers	GBAN	Producto
npy	Fwd: 5'GCCAGATACTACTCCGCTCTG-3'	NM_023456.3	68 pb
	Rev: 5'-GCCAGATACTACTCCGCTCTG-3'		
pomc	Fwd: 5'-CCTCCTGCTTCAGACCTCCATA-3'	NM_008895.3	159 pb
	Rev: 5'-TGTCATCTCCGTTGCCTGG-3'		
ghsr	Fwd: 5'-GCTCTGCAAACCTCTTCCA-3'	NM_177330.4	99 pb
	Rev: 5'-AAGCAGATGGCGAAGTAG-3'		

Tabla 2. *Primers* empleados en las reacciones de PCR tiempo real. Fwd, forward; Rev, reverse; GBAN, número de acceso a GenBank; pb, longitud del amplificado en pares de bases.

5.1.3. Ensayo de unión de F-ghrelina

Para estudiar los niveles proteicos de GHSR se realizó un ensayo de unión de F-ghrelina en un grupo independiente de ratones WT pertenecientes a los grupos experimentales descritos en la **Figura 4** (n=4 grupo alimentado, n=7 grupo ayunado, n=4 grupo 2-d realimentado y n=4 grupo 4d-realimentado). La F-ghrelina, provista por el Dr. Luyt de la Universidad de Western Ontario (Canadá), es un análogo de 19-aminoácidos de la ghrelina conjugada con isotiocianato de fluoresceína a través de la adición de una lisina en su extremo C-terminal ([Dproctanoil] 3, Lys (fluoresceína) 19]-ghrelina) (McGirr et al., 2011, Cabral et al., 2013). Estudios previos realizados en el Laboratorio de Neurofisiología, mostraron que la F-ghrelina se comporta de manera similar a la ghrelina endógena en cuanto a afinidad y especificidad por GHSR. Particularmente, se ha mostrado que: a) es bioactiva *in vivo*; b) marca los núcleos cerebrales en el cerebro de ratón con una distribución similar al patrón de expresión del ARNm de GHSR; y c) no marca núcleos cerebrales en el cerebro de los ratones GHSR(-/-) (Cabral et al., 2013). Para llevar a cabo estos experimentos, los ratones WT se anestesiaron en la mañana del día experimental, se colocaron en el estereotáxico y se inyectaron ICV con 4 µL de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa) conteniendo 60 pmol/ratón de F-ghrelina. Todas las inyecciones se realizaron a un flujo constante durante 2 minutos a través de un inyector calibre 30 que se extiende 0,5 mm por debajo de la cánula guía, el cual se encuentra conectado a través de un tubo de polietileno a una jeringa Hamilton. Luego de cada inyección, se dejó el inyector dentro de la cánula durante 2 minutos para evitar el reflujo de la solución inyectada. A los 30 minutos post-inyección, los ratones se perfundieron y se obtuvieron sus cerebros, los cuales se cortaron y una de las series de cortes coronales se sometió a una inmunohistoquímica contra fluoresceína. Finalmente, los cortes fueron montados y se micro-fotografiaron con un microscopio de campo claro (Ver secciones “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*” e “*Inmunohistoquímicas*” más adelante). En estas secciones de cerebro, se evaluó la cantidad neuronas y la densidad de señal punteada compatible con un perfil pre-sináptico que unen F-ghrelina en cada grupo experimental (Ver sección “*Análisis neuroanatómico cuantitativo*”).

5.1.4. Estudios neuroanatómicos en el núcleo ARC

Para estudiar la activación del núcleo ARC y la biosíntesis de los principales neuropéptidos de este núcleo se utilizó un grupo independiente de ratones WT o GHSR(-/-) pertenecientes a los grupos experimentales descritos en la **Figura 4**. Los ratones fueron perfundidos y los cerebros obtenidos se procesaron para posteriormente someter cada sección de cortes coronales a distintas inmunohistoquímicas contra: el marcador de activación neuronal c-Fos, NPY, POMC y AgRP (Ver sección “*Inmunohistoquímicas*”). En este estudio se utilizó 1 serie de un total de 4 para cada inmunohistoquímica usando en total: 32 ratones WT: n=7 alimentados, n=8 ayunados, n=5 2d-realimentados, n=6 4d-realimentados y n=6 6d-realimentados; 13 ratones GHSR(-/-): n=6 alimentados y n=7 ayunados, y 12 ratones WT hermanos de camada de los GHSR(-/-): n=5 alimentados y n=7 ayunados. Las secciones fueron montadas secuencialmente en portaobjetos de vidrio y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje para la visualización al microscopio y la realización de los análisis cuantitativos correspondientes (Ver sección “*Análisis neuroanatómico cuantitativo*”). Además, también se utilizó un grupo de animales

NPY-GFP (n=7 alimentados y n=8 ayunados) y sus hermanos GHSR(-/-)/NPY-GFP (n=4 alimentados y n=5 ayunados) los cuales se perfundieron y sus secciones coronales de cerebro se analizaron directamente al microscopio de fluorescencia.

5.1.5. Ensayos farmacológicos

Para estudiar la dependencia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la hiperfagia compensatoria que se observa luego de un ayuno también se utilizaron animales WT tratados con moduladores de la actividad de GHSR bajo el protocolo de ayuno-realimentación descrito anteriormente (**Figura 4**). Para realizar las inyecciones, en primer lugar se implantaron cánulas permanentes en el ventrículo lateral de los animales, y posteriormente se alojaron en jaulas individuales por 5 días con libre acceso a comida y agua hasta su total recuperación. En la mañana del día experimental, los ratones se ayunaron y se comenzaron con las inyecciones seriadas cada 8 hs, comenzando a las 16:00 hs del primer día de ayuno y finalizando a las 8:00 hs del segundo día, recibiendo cada ratón 6 inyecciones en total durante el periodo de ayuno. Posteriormente, los animales fueron realimentados a las 10:00 hs, donde se monitoreó el peso corporal y el consumo de alimento manualmente durante el periodo de realimentación como se detalló previamente. Luego de cada inyección, el inyector se dejó dentro de la cánula durante 2 minutos para evitar el reflujo de la solución inyectada.

Para este estudio, se utilizaron 4 grupos experimentales: ratones tratados con los moduladores de la actividad de GHSR: [D-Lys3]-GHRP-6 (2 nmoles/ratón, n=5), JMV-2959 (3 nmoles/ratón, n=8) o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ (1 nmol/ratón, n=13) y ratones control tratados con vehículo (LCRa, n=19 en total, n=7 como control de los dos primeros ligandos descriptos y n=12 como control del tercer ligando descripto). Es importante destacar que el [D-Lys3]-GHRP-6 es una droga comercial que ha sido previamente utilizada en otros estudios, mientras que el JMV-2959 y el K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ no están disponibles comercialmente y han sido provistos por el Dr. Jacky Marie de la Universidad de Montpellier, Francia. Las dosis utilizadas se basaron en estudios previos que muestran su efectividad farmacológica (Asakawa et al., 2003, Salome et al., 2009, Els et al., 2012) como así también en estudios propios realizados en nuestro laboratorio. En primer lugar, se estudió el efecto sobre la ingesta de alimento inducida por la administración central de ghrelina. Para esto, se utilizaron ratones con cánulas permanentes implantadas en el ventrículo lateral los cuales, en la mañana del día experimental, fueron inyectados con 2 µL de LCRa conteniendo o no los diferentes moduladores de GHSR. 15 minutos después, los ratones fueron inyectados con 20 pmol/ratón de ghrelina y se evaluó la ingesta de alimento a los 30, 60 y 120 minutos después mediante el pesaje del pellet remanente y sustrayéndolo al peso del pellet ofrecido inicialmente. En base a esto, las dosis elegidas para JMV-2959 y [D-Lys3]-GHRP-6 redujeron la ingesta de alimento inducida por la administración central de ghrelina en un $72,0 \pm 5,0$ % (n=5) y un $42,4 \pm 4,0$ % (n=8), respectivamente; mientras que la dosis elegida para el K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ redujo la ingesta un $81,0 \pm 5,6$ % (n=19) respecto a los animales inyectados con LCRa. Por otro lado, se utilizaron ratones alimentados *ad libitum* para estudiar el efecto de K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ sobre la ingesta nocturna durante la primera fase del periodo de oscuridad (de 18:00 a 23:00 hs). Para esto se utilizaron ratones con cánulas permanentes implantadas en el ventrículo lateral los cuales fueron administrados previo al inicio de la fase oscura con 2 µL de LCRa conteniendo o

no K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ (n=20 y n=11, respectivamente). El estudio se realizó usando un diseño experimental cruzado, en donde los animales fueron inyectados aleatoria- y alterativamente en días consecutivos. Así, el péptido K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ redujo la ingesta nocturna durante la primera fase del período de oscuridad en comparación con la inyección de LCRa ($160,0 \pm 41,3$ mg vs $595,0 \pm 71,7$ mg, respectivamente). Además, la dosis utilizada no afectó la ingesta nocturna en ratones GHSR(-/-) (n=4 con LCRa y n=4 con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂).

Otro grupo independiente de animales tratados de la misma forma durante el ayuno con LCRa (n=6) o el péptido K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ (n=6) se sacrificó al finalizar el periodo de ayuno para realizar los posteriores análisis neuroanatómicos mediante inmunohistoquímicas contra c-Fos, NPY y AgRP (Ver secciones “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*” e “*Inmunohistoquímicas*” más adelante).

5.2. Estudio del rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en una condición de ayuno.

5.2.1. Protocolo experimental

Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizaron ratones WT, modificados genéticamente o ratones con el ARC-lesionado, sometidos o no a un protocolo de ayuno como se describe antes. Los animales se perfundieron y se extrajeron sus cerebros, los cuales se cortaron en secciones coronales para realizar los posteriores procesamiento por inmunohistoquímicas (Ver secciones “*Perfusión y preparación de muestras de cerebro*” e “*Inmunohistoquímicas*” más adelante).

5.2.2. Determinaciones plasmáticas

En un estudio independiente, los ratones WT o GHSR(-/-) alimentados o ayunados se sacrificaron por decapitación a las 10:00 hs de cada día experimental. Las muestras de sangre troncal colectadas se utilizaron para medir corticosterona y glucosa en plasma. En este estudio se usaron 25 ratones WT: n=12 alimentados y n=13 ayunados, y 15 ratones GHSR(-/-): n=7 alimentados y n=8 ayunados.

-Determinación de corticosterona: las muestras de sangre colectadas de cada grupo experimental se colocaron en tubos conteniendo EDTA (1mg/ml final) en hielo. Posteriormente, las muestras de sangre se centrifugaron y se separaron los plasmas para la medida de corticosterona por medio de un kit específico de ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA, de sus siglas en inglés para *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

-Determinación de glucosa: (ver sección “5.1.2. Determinaciones plasmáticas; determinación de glucosa”).

5.2.3. Estudios neuroanatómicos en el núcleo NPV

Para estudiar la activación y los cambios en las aferencias al NPV durante el ayuno, se utilizaron las secciones coronales obtenidas de los cerebros de los ratones alimentados o ayunados descritos anteriormente (5.2.1. *Protocolo experimental*) los cuales se sometieron a inmunohistoquímicas contra CRF, c-Fos/CRF, NPY y AgRP (Ver sección “*Inmunohistoquímicas*”). En este estudio se utilizó 1 serie de un total de 4 para cada inmunohistoquímica usando en total: 10 ratones WT: n=4 alimentados, n=6 ayunados; 10 ratones GHSR(-/-): n=4 alimentados y n=6 ayunados; 9 ratones WT hermanos de camada

de los GHSR(-/-): n=4 alimentados y n=5 ayunados; 11 ratones con el ARC-intacto: n=4 alimentados y n=7 ayunados y 9 ratones con el ARC-lesionado: n=3 alimentados y n=6 ayunados. Las secciones coronales se montaron secuencialmente en portaobjetos de vidrio y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje para poder visualizarlas al microscopio y realizar los análisis neuroanatómicos cuantitativos correspondientes en el NPV (Ver sección “*Análisis neuroanatómico cuantitativo*”). Además, también se utilizó un grupo de animales NPY-GFP (n=7 alimentados y n=8 ayunados) y sus hermanos de camada GHSR(-/-)/NPY-GFP (n=4 alimentados y n=5 ayunados) los cuales se perfundieron y sus secciones coronales de cerebro se analizaron directamente al microscopio de fluorescencia.

5.2.4. Ensayos farmacológicos

Para estudiar la dependencia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas y los cambios en las preferencias al NPV también se utilizaron animales WT tratados con un modulador de la actividad de GHSR durante el periodo de ayuno. Como se especificó en la sección 5.1.5. “*Ensayos farmacológicos*”, se utilizaron animales WT previamente implantados con una cánula guía permanente por la cual posteriormente se realizaron las inyecciones ICV cada 8 hs durante el periodo de ayuno con LCRa o con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ (n=6 por grupo). Los ratones recibieron en total 6 inyecciones durante el periodo de ayuno y luego se anestesiaron, se perfundieron, se extrajeron sus cerebros y se cortaron en secciones coronales destinadas al posterior análisis neuroanatómico mediante inmunohistoquímicas contra AgRP, CRF y c-Fos.

5.3. Estudio del rol de la hormona DAG sobre el sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico.

5.3.1. Ensayo de unión de la F-DAG

Para estudiar los sitios de unión de la DAG se realizó un ensayo de unión de F-DAG en un grupo de ratones WT alimentados *ad libitum*. La F-DAG, al igual que la F-ghrelina utilizada anteriormente, fue provista por el Dr. Luyt de la Universidad de Western Ontario (Canadá). La F-DAG es un análogo de 19-aminoácidos de la DAG conjugada con isotiocianato de fluoresceína a través de la adición de una lisina en su extremo C-terminal ([Dproctanoil] 3, Lys (fluoresceína) 19]-DAG). Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron ratones con cánulas permanentes implantadas en el ventrículo lateral los cuales, luego de 5 días de recuperación, fueron inyectados con 2 µL de LCRa conteniendo o no 500 pmol/ratón de F-DAG (n=4 y n=5, respectivamente). Para determinar la especificidad del ensayo, se administró 120 pmol/ratón de F-DAG solo (n=3) o una mezcla de 120 pmol/ratón de F-DAG con 1200 pmol/ratón de DAG sin marca (n=3). Si la unión de F-DAG resultase específica, debería ser totalmente desplazada por el exceso de DAG sin marcar, con la consecuente disminución de la señal observada al microscopio de fluorescencia. Todas las inyecciones se realizaron a un flujo constante durante 2 minutos a través de un inyector calibre 30 que se extiende 0,5 mm por debajo de la cánula guía, el cual se encuentra conectado a través de un tubo de polietileno a una jeringa Hamilton. Luego de cada inyección, se dejó el inyector dentro de la cánula durante 2 minutos para evitar el reflujo de la solución inyectada. Luego de 30 minutos post-inyección, los animales se perfundieron y se extrajeron sus cerebros, los cuales se cortaron en secciones coronales para la posterior realización de una inmunohistoquímica fluorescente contra fluoresceína y la subsiguiente examinación al microscopio de fluorescencia (Ver secciones “*Perfusión y preparación de muestras de*

cerebro” y *“Inmunohistoquímicas”* más adelante). En estas secciones de cerebro, se evaluaron los sitios cerebrales accesibles a F-DAG inyectada centralmente como así también el número de células que la unen (Ver sección *“Análisis neuroanatómico cuantitativo”*).

Posteriormente, para estudiar el fenotipo de las células marcadas con F-DAG, se utilizó un grupo independiente de ratones WT inyectados por vía ICV con colchicina (16 μ g en 4 μ L por ratón, n=4) utilizando las coordenadas descriptas anteriormente (ver sección 4 *“Cirugías estereotáxicas”*). Luego de dos días, los ratones se inyectaron con F-DAG y 30 minutos después se perfundieron, se obtuvieron sus cerebros los cuales se procesaron para luego ser sometidos a inmunohistoquímicas fluorescentes contra NPY, POMC y vimentina (Ver sección *“Inmunohistoquímicas”*). Las secciones coronales se montaron secuencialmente en portaobjetos de vidrio los cuales fueron cubiertos por cubreobjetos con medio de montaje para poder visualizarlos al microscopio de fluorescencia y evaluar el grado de co-localización.

5.3.2. Estudio de la bioactividad de DAG

Para estudiar el efecto de la DAG sobre la ingesta de alimentos, se utilizó otro grupo de ratones implantados con cánulas permanentes en el ventrículo lateral los cuales se expusieron a 2 grupos de experimentos diferentes. En primer lugar, se los administró con 2 μ L de LCRa conteniendo o no 300 pmol/ratón de DAG a las 18:45 hs, previo al inicio del ciclo de oscuridad. El estudio se realizó usando un diseño experimental cruzado, en donde los animales fueron inyectados aleatoria- y alterativamente en días consecutivos (n=17). La ingesta de alimentos se midió a las 22.00 hs y a las 7:00hs del día siguiente, determinándola mediante la sustracción del peso del alimento remanente al peso del alimento ofrecido inicialmente. La dosis utilizada ha sido previamente estudiada mostrando que la DAG afecta la ingesta de alimentos (Asakawa et al., 2005). Después de 2 días de recuperación, los mismos animales se expusieron a un protocolo de ayuno-realimentación a corto plazo. En este caso, el alimento se retiró de las jaulas a las 18:00 hs y, a las 10:00 hs del día siguiente, se los administró con 2 μ L de LCRa conteniendo o no 300 pmol/ratón de DAG (n=8 y n=9, respectivamente). Inmediatamente después de las inyecciones, los ratones fueron realimentados, dejándoles libre acceso a un pellet de dieta estándar previamente pesada. La ingesta de alimento se controló a las 0,5, 1, 2 y 12 hs post-inyección por pesada del pellet remanente y diferencia del peso respecto del inicial.

Posteriormente, se estudió la potencial interacción de la DAG con la ghrelina evaluando el consumo de alimentos y la activación neuronal del ARC en un grupo independiente de ratones implantados con cánulas permanentes en el ventrículo lateral. A las 10:00 hs del día experimental, los ratones fueron inyectados ICV con 2 μ L de LCRa conteniendo o no 300 pmol/ratón de DAG. 15 minutos después, los mismos ratones se inyectaron por vía subcutánea (SC) o ICV con una dosis de 60 pmoles/g de peso corporal o 300 pmoles/ratón de ghrelina, respectivamente. El efecto orexigénico de las dosis de ghrelina utilizadas han sido caracterizadas previamente en estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (Cabral et al., 2014). El pre-tratamiento con DAG se realizó 15 minutos antes del tratamiento con ghrelina basándose en la corta vida media del péptido (~30 minutos) (Akamizu et al., 2005). Los grupos experimentales fueron los siguientes: vehículo ICV + vehículo SC (n=8), DAG ICV + vehículo SC (n=7), vehículo ICV + ghrelina SC (n=20), DAG ICV + ghrelina SC (n=6), vehículo ICV + ghrelina ICV (n=11) y DAG ICV + ghrelina ICV (n=6). 2 horas después del tratamiento, los animales se perfundieron y se

obtuvieron los cerebros para el posterior procesamiento por inmunohistoquímica contra c-Fos. Entre las inyecciones y sacrificios, los ratones fueron expuestos a una cantidad pre-pesada de alimento para determinar a ingesta de alimentos.

De la misma manera, y para testear si el péptido F-DAG afecta la ingesta de alimentos y la activación neuronal del ARC, se realizó el mismo experimento descrito anteriormente, usando F-DAG en lugar de DAG. En este caso, se usaron un total de 12 ratones WT agrupándolos en los siguientes grupos experimentales: vehículo ICV + vehículo SC (n=3), F-DAG ICV + vehículo SC (n=7), vehículo ICV + ghrelina SC (n=3) y F-DAG ICV + ghrelina SC (n=3).

Adicionalmente, para estudiar si la unión y activación neuronal del ARC depende de GHSR, se utilizó un grupo de ratones GHSR(-/-) para realizar el ensayo de unión de F-DAG tal como se describió en la sección 5.3.1. “*Ensayo de unión de F-DAG*”. Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron ratones GHSR(-/-) con cánulas permanentes implantadas en el ventrículo lateral los cuales, luego de 5 días de recuperación, se inyectaron ICV con 2 μ L de LCRa conteniendo o no 500 pmol/ratón de F-DAG (n=3 y n=5, respectivamente). 30 minutos post-inyección se perfundieron y se procesaron las muestras como describimos anteriormente. Para determinar la ingesta de alimentos y la activación neuronal del ARC, se utilizó un grupo independiente de animales GHSR(-/-) inyectados ICV con 2 μ L de LCRa conteniendo o no 300 pmol/ratón de DAG (n=5 y n=6, respectivamente). 2 horas después del tratamiento, los animales se perfundieron y se extrajeron sus cerebros para el posterior procesamiento por inmunohistoquímica contra c-Fos. Entre las inyecciones y sacrificios, los ratones se expusieron a una cantidad pre-pesada de alimento para determinar a ingesta de alimentos.

6. Perfusión y preparación de muestras de cerebro

Para fijar las muestras de cerebro, los ratones se perfundieron trans-cardiacamente con formaldehído al 4% como fijador. Inicialmente, los ratones se anestesiaron y se sujetaron a una mesa de cirugía por las extremidades con el abdomen hacia arriba. Luego, cavidad torácica se abrió con el objetivo de acceder al corazón. El sistema de perfusión se conectó directamente al ventrículo izquierdo del corazón con una aguja 22G, y luego se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado. Inicialmente, los ratones se perfundieron con una solución de lavado (PBS 0,01 M pH 7,4 conteniendo 10 UI/ml de heparina) a un flujo de 5 mL/minuto durante 2 minutos. Luego, se perfundieron con el fijador, formaldehído al 4%, durante 10 minutos a un flujo de 5 mL/minuto. Al finalizar la perfusión, los cerebros se aislaron y se post-fijaron en una solución de formaldehído al 4% durante 2 horas. Finalmente los cerebros se crio-preservaron mediante la incubación en una solución de sacarosa al 20% durante toda la noche. Al día siguiente, los cerebros se congelaron en hielo seco y se cortaron en 4 series equivalentes de secciones coronales de 40 μ m de espesor utilizando un criostato (Leica, CM1860). En caso de los cerebros provenientes de ratones inyectados con F-ghrelina o F-DAG la crio-preservación se realizó en una solución de sacarosa al 20% más formaldehído al 1%. El procesamiento posterior se realizó de igual manera para todos los cerebros.

7. Inmunohistoquímicas (IHQs) y tinciones

Todas las IHQs se realizaron sobre secciones coronales de cerebro en flotación.

a. IHQs cromogénicas simples

Protocolo general para todas las IHQs cromogénicas simples: en primer lugar, las secciones coronales de cerebro se lavaron 3 veces durante 10 minutos cada vez con PBS en agitación. Posteriormente, se incubaron con 10 mL de H₂O₂ 0,5% en PBS durante 30 minutos. Luego de otros 3 lavados, las secciones de cerebro se incubaron con solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% TritonX en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se incubaron con el anticuerpo primario específico para cada IHQ en las condiciones experimentales que se especifican en la **Tabla 3**. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron nuevamente 3 lavados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 3**). Luego de 1 hora, las secciones se lavaron y se incubaron nuevamente durante 1 hora con el complejo avidina-peroxidasa biotinilada. Finalmente se reveló la reacción con el sustrato 3,3'-diaminobencidina comercial en presencia o ausencia de NiCl₂, lo cual produjo un precipitado negro-violeta o marrón, respectivamente. El tiempo de revelado para cada IHQ cromogénica simple se especifica en la **Tabla 3**.

b. IHQs cromogénicas dobles

Las IHQs dobles se realizaron durante cuatro días. En primer lugar, se realizaron las IHQs contra los antígenos nucleares, c-fos en nuestro caso, como se describió anteriormente y luego de realizar 3 lavados durante 10 minutos cada uno con PBS, a las secciones de cerebro se trataron con los anticuerpos que reconocen antígenos citoplasmáticos: CRF y POMC en nuestro caso (**Tabla 3**). A las 48 hs, las secciones de cerebro se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 3**) y con el complejo peroxidasa biotinilada-avidina como se detalló anteriormente. En este caso, la IHQ nuclear se reveló con solución de 3,3'-diaminobencidina con el agregado de NiCl₂, y las IHQs citoplasmáticas e revelaron en ausencia de NiCl₂, obteniendo un precipitado nuclear negro-violeta y un precipitado citoplasmático marrón.

c. IHQ fluorescente simple

En primer lugar, las secciones coronales de cerebro se lavaron 3 veces durante 10 minutos cada vez con PBS en agitación. Luego, se incubaron con solución bloqueante (3% suero normal de burro y 0,25% TritonX en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, y finalmente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 48 hs a 4°C. A continuación, y luego de realizar 3 lavados, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo elegido (**Tabla 3**).

d. IHQs fluorescentes dobles

Para las IHQs fluorescentes dobles las secciones de cerebro se trataron de igual forma que describimos anteriormente para cada IHQ fluorescente simple, pero en este caso se incubaron con los dos anticuerpos primarios juntos, el anti-fluoresceína conjugado con Alexa 488 sumado al segundo anticuerpo primario correspondiente. Finalmente, y luego de realizar 3 lavados, las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa 594 correspondiente al

segundo anticuerpo utilizado (**Tabla 3**) .

Para todas las IHQs se realizaron controles, en los cuales se procesaron las secciones de cerebro con los mismos protocolos que describimos anteriormente, pero sin el agregado de anticuerpo primario o secundario.

Para el caso particular de las IHQs cromogénicas, una vez finalizadas, las secciones se montaron secuencialmente en orden antero-posterior en portaobjetos de vidrio previamente gelatinizados, se deshidrataron en sucesivos pasajes por alcoholes de concentración creciente (2 min en etanol 70 %, 96 %, 100 % y, finalmente, 30 min en xileno) y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje (Bálsamo de Canadá) para su posterior examen al microscopio óptico de campo claro. En el caso de las IHQs fluorescentes, las secciones se montaron secuencialmente cuidándolas de la luz y se colocó directamente el cubreobjetos con un medio de montaje que atenúa el fenómeno de blanqueamiento (DABCO + Hoescht) para observarlas al microscopio de fluorescencia.

e. Coloración de Nissl:

En primer lugar, las secciones coronales de cerebro se montaron secuencialmente en portaobjetos de vidrio, se lavaron durante 1 minuto en H₂O destilada y se incubaron con solución de Tionina al 0,1% durante 20 min. Finalmente, las secciones se deshidrataron pasándolas 1 vez durante 1 minuto por H₂O destilada, luego 2 veces de 1 minuto por alcohol 96°, 2 veces de 1 minuto por alcohol 100° y por último 5 minutos por xilol. Finalmente se colocó el cubreobjeto con medio de montaje (Bálsamo de Canadá). Esta coloración tiñe los cuerpos de Nissl que son acumulaciones basófilas que se encuentran en el citoplasma de las células nerviosas.

Anticuerpo primario	Concentración	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación	Anticuerpo secundario	Tiempo de revelado
Anti NPY	1/30000 cromogénica	4°C	48 hs	Anti-Conejo biotinilado 1/3000	10 min
Anti NPY	1/7000 fluorescente	4°C	48 hs	Anti-Conejo Alexa 594 1/1000	2 hs
Anti c-Fos	1/2000 cromogénica	4°C	48 hs	Anti-Conejo biotinilado 1/3000	10 min
Anti POMC	1/6000 cromogénica	T amb	24 hs	Anti-Conejo biotinilado 1/3000	10 min
Anti POMC	1/3000 fluorescente	4°C	48 hs	Anti-Conejo Alexa 594 1/1000	2 hs
Anti Fluoresceína	1/7000 cromogénica	4°C	48 hs	Anti-Cabra biotinilado 1/2000	7 min
Anti Fluoresceína Alexa 488	1/100 fluorescente	4°C	48 hs		
Anti CRF	1/2000 cromogénica	4°C	48 hs	Anti-Conejo biotinilado 1/3000	7 min
Anti AgRP	1/1000 fluorescente	4°C	48 hs	Anti-Conejo Alexa 594 1/1000	2 hs
Anti vimentina	1/2000 fluorescente	4°C	48 hs	Anti-Gallina Alexa 594 1/2000	2 hs

Tabla 3. Anticuerpos utilizados con sus respectivas condiciones experimentales de uso.

8. Análisis Neuroanatómico Cuantitativo

Para realizar el análisis neuroanatómico cuantitativo se utilizó el atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001) para identificar las secciones coronales del cerebro y localizar los límites anatómicos de cada región cerebral analizada. Tanto el ARC como el NPV se estudiaron bilateralmente entre los bregmas -1.58 and -1.94 mm y -0,70 mm y -0,94 mm, respectivamente.

8.1. Conteo de células inmuno-reactivas (IR)

Para determinar el número total de células-IR para los diferentes antígenos analizados en cada núcleo cerebral, las células se cuantificaron a través de todo el núcleo en 1 de 4 series completas de las secciones coronales de 40 μ m obtenidas. Los datos se expresaron como el número de células IR/sección/lado, en la cual el número de células totales cuantificadas en 1 de series de secciones coronales se dividió por el número de secciones en las que se realizaron los recuentos. Todos los análisis cuantitativos se realizaron de manera independiente por al menos 2 observadores. Con el fin de obtener el número real de neuronas, la doble contabilización se corrigió de acuerdo al método de Abercrombie (Abercrombie, 1946), en el cual el número total de células contabilizadas se multiplica por un factor de corrección que se calcula con la fórmula: $T/(T+h)$, donde T= espesor del corte, y h= el diámetro medio de la célula a lo largo del eje perpendicular al plano de la sección. El diámetro medio de las células cuantificadas se determinó en al menos 30 células o núcleos con el programa Fiji-ImageJ (Schindelin et al., 2012).

En el caso de las secciones de cerebro con doble IHQ, por un lado se determinó el número total de células-IR para ambos marcadores y por el otro, el número de células-IR para cada uno de los marcadores por separado. Luego, se expresaron los resultados como el porcentaje de células con co-localización respecto del total de las células-IR para cada uno de los marcadores por separado. Finalmente, los valores mostrados resultan del promedio de los valores de los distintos animales de cada grupo experimental.

La nomenclatura utilizada para identificar a las células que presentaron señal-IR para un determinado marcador neuronal fue: el nombre del marcador analizado acompañado de un signo + (indicando señal positiva) inmediatamente por detrás. Adicionalmente, las células que no presentaron inmuno-reactividad para algún marcador neuronal se denotaron con un signo – (indicando señal negativa) por detrás.

El análisis cuantitativo de la señal fluoresceína+ en los diferentes sitios del cerebro se realizó a través de la cuantificación tanto del número de células como de la señal fluoresceína+ punteada, las cuales se compararon con la señal obtenida en los controles negativos. En este caso, además de los controles sin el agregado de anticuerpo primario o secundario, también se utilizó la IHQ contra fluoresceína en secciones de cerebro de ratones inyectados centralmente con LCRa. Para realizar estos análisis, se cuantificó el número total de células fluoresceína+ y se expresó como células/sección/lado; mientras que la señal punteada se cuantificó en microfotografías a alta magnificación de las áreas cerebrales de interés, usando el software Fiji (Schindelin et al., 2012), y expresándolas como puntos/100 mm^2 . Particularmente, para realizar el análisis neuroanatómico detallado de los sitios de unión de F-DAG, se re-utilizaron las mismas series montadas para tomar las microfotografías al microscopio de fluorescencia, a las cuales

posteriormente se les retiró cuidadosamente el cubreobjetos, se lavaron, y se les realizó una coloración de Nissl. Solo en este caso, se expresó el valor obtenido como el número de células totales en el ARC, el cual se calculó multiplicando el número de células contadas en una serie por la cantidad de series completas de secciones coronales de 40 μm obtenidas.

Para el análisis topográfico de la distribución de células c-Fos⁺ dentro del ARC de los animales inyectados con DAG se utilizaron imágenes digitales. Para esto, se tomaron imágenes de campo claro con un objetivo de 10X entre los bregmas -1,64 y -1,88 donde se encontraron concentradas las células c-Fos⁺. En cada imagen, se delimitaron dos cuadrados (400 x 400 μm), uno sobre cada ARC. Específicamente, se utilizó el límite ventral del cerebro y la pared ventricular como referencias de alineación para los bordes inferior y medial, respectivamente, de cada ARC. Cada cuadrado se subdividió a su vez en cuatro cuadrantes de igual tamaño; así, el cuadrante superior cercano al ventrículo corresponde a la subregión dorsal del ARC (dARC), mientras que los cuadrantes inferiores ubicados cerca o lejos del ventrículo corresponden a las subregiones ventro-medial (vmARC) o ventro-lateral del ARC (vlARC), respectivamente. Para el análisis cuantitativo, se registró manualmente la posición de cada célula c-Fos⁺ dentro de cada cuadrante, excluyendo aquellas que pertenecen a la pared endimaria. Luego, el número de células c-Fos⁺/muestra/cuadrante se calculó promediando todos los cuadrantes correspondientes (izquierdo y derecho) que pertenecen a las imágenes de la misma muestra. Finalmente, se calculó el número promedio de células c-Fos⁺ para los tres cuadrantes para cada grupo experimental. Para obtener la distribución espacial global de las células c-Fos⁺, se subdividió cada cuadrado en una cuadrícula de 32 x 32 contenedores (12,5 μm por lado) y se calculó el número promedio de células c-Fos⁺ por contenedor para cada grupo experimental. El resultado final se representó como mapas de densidad codificados por colores. Todos estos procedimientos se realizaron utilizando el programa Fiji (Schindelin et al., 2012).

8.2. Análisis de la intensidad y densidad de señal-IR

Para estimar la intensidad de señal fluorescente de F-DAG en el ARC, se obtuvieron microfotografías a color en 16 bits, a las cuales se les corrigió la no-uniformidad de iluminación utilizando una imagen de referencia fluorescente con un campo homogéneo. La contribución de la auto-fluorescencia tisular al canal verde fue estimada utilizando el canal rojo, y se generó una nueva imagen restando a la imagen original la fracción obtenida en el canal rojo, para obtener una lectura media de cero en las áreas sin marca en el parénquima. Finalmente, se cuantificó la intensidad media de fluorescencia corregida en todo el ARC. Nuevamente se utilizó el software Fiji para el procesamiento y cuantificación de las imágenes (Schindelin et al., 2012).

Para el análisis cuantitativo de la intensidad de señal en el NPV en secciones de cerebro teñidas con DAB, en primer lugar se obtuvieron microfotografías a color de las áreas a cuantificar en un microscopio de campo claro con las mismas condiciones ópticas de luz. A las imágenes de 16 bits resultantes se les corrigió la no-uniformidad de iluminación y se transformaron a escala de grises. Finalmente se cuantificó la densidad óptica (DO) promedio utilizando el software Fiji (Schindelin et al., 2012). Para esto, los valores de intensidad de cada pixel fueron convertidos a DO tomando el logaritmo decimal negativo del cociente entre el valor original de cada pixel y el valor del fondo promedio sin muestra. También se determinó un fondo no específico en un área cerebral donde no se encontró señal positiva y,

finalmente, el valor de DO para cada imagen se correspondió con la densidad promedio de señal IR a la que se le restó el nivel de señal correspondiente al fondo de la muestra.

Para la cuantificación de la señal AgRP+ y GFP+ en el NPV se adquirieron microfotografías de fluorescencia a alta magnificación de los cortes correspondientes, asegurándose de incluir exclusivamente la porción de este núcleo donde están presentes las neuronas CRF. Se utilizó un objetivo 63X/1.4NA en la modalidad de luz estructurada a través del sistema Zeiss Apotome.2. Para cada imagen se obtuvo el histograma y se estimó el nivel de fondo ajustando una curva gaussiana, que coincidió con el pico dominante. Con los parámetros de esta curva se calculó un umbral de detección de señal específica, que fue definido como la media de la distribución más cinco desviaciones estándar. De esta manera se umbralizó cada imagen y se generó una región de interés para determinar el área de señal específica, el valor medio de señal específica dentro de la región, y la densidad de señal integrada. Los valores de intensidad fueron corregidos por sustracción de la media del fondo. El valor medio o intensidad de señal específica dentro de la región analizada se interpretó como la concentración del antígeno marcado, el área de señal específica como el número de elementos dentro de la región analizada que contiene el antígeno marcado, y la densidad integrada (la multiplicación de los dos parámetros anteriores) representó la cantidad del antígeno marcado presente en la región analizada.

Todas las cuantificaciones correspondientes a intensidad, área y densidad de señal específica se expresaron como los valores promedios normalizados con el grupo control correspondiente a los animales WT alimentados.

9. Obtención de Imágenes

Las imágenes fluorescentes fueron adquiridas a baja y alta magnificación con un microscopio Zeiss Axio Observer D1 equipado con un módulo de iluminación estructurada Apotome.2 y una cámara monocroma Axiocam 506 o un microscopio Nikon Eclipse 50i y una cámara digital Nikon DS-Ri1, dependiendo cada caso. La fluoresceína, el GFP y el fluoróforo Alexa 488 fueron excitados a 488 nm mientras que el fluoróforo Alexa 594 fue excitado a 594 nm.

Todas las imágenes de campo claro fueron adquiridas a baja y alta magnificación, usando un microscopio Nikon Eclipse 50i y una cámara digital Nikon DS-Ri1, en 8 o 16 bits y en formato tif.

Para la edición de imágenes se utilizaron dos programas: el Adobe Photoshop CS3 para ajustar el tamaño, contraste y brillo de las microfotografías, y el Fiji para cuantificar la DO, la intensidad, el área y la densidad integrada de señal+ en los núcleos cerebrales correspondientes.

10. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.0 o el programa IBM SPSS Statistics. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico utilizado dependió de cada condición experimental. El análisis de normalidad se realizó mediante el test de D'Agostino-Pearson y los análisis de igualdad de varianza usando los Test de Barlett o Levene. Para los análisis estadísticos que involucraron dos grupos experimentales, se utilizó la prueba t

de Student no apareado con corrección de Welch. Para el análisis de más de dos grupos experimentales se utilizó ANOVA de una vía. Cuando las varianzas fueron iguales, se utilizó la prueba *post-hoc* de Tukey o Bonferroni para determinar las diferencias significativas entre los grupos, y cuando las varianzas fueron distintas, se utilizó la prueba *post-hoc* de Games-Howell. Finalmente, el test de ANOVA de dos vías, usando la prueba *post-hoc* de Tukey o Bonferroni, se utilizó para comparar los datos entre dos genotipos ante dos tratamientos, para comparar las respuestas de los consumos de alimento y peso corporal de los protocolos de ayuno-realimentación de los diferentes genotipos y tratamientos farmacológicos analizados y para comparar los datos entre dos pre-tratamientos sobre varios tratamientos posteriores. Finalmente, el test de ANOVA de dos vías con medidas repetidas usando la prueba *post-hoc* de Bonferroni se utilizó para comparar el impacto de dos pre-tratamientos en el ciclo oscuro de la ingesta de alimentos y la fase de realimentación después del ayuno nocturno.

Todas las interacciones y las significancias se especifican en las leyendas de cada figura excepto cuando no haya una figura asociada.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1
ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DE LA SEÑALIZACIÓN DEL
SISTEMA GHRELINA/GHSR EN LA HIPERFAGIA COMPENSATORIA
INDUCIDA POR AYUNO

a) **Análisis de los patrones de ingesta, actividad locomotora y cambios del peso corporal luego un ayuno**

Con el objetivo de caracterizar los cambios que ocurren en los patrones diarios de alimentación y en el peso corporal luego de un ayuno, expusimos a ratones WT al protocolo de ayuno-realimentación descrito en la **Figura 4** de la sección “Materiales y Métodos”.

El consumo de alimento diario de animales alimentados *ad libitum* fue de $3,43 \pm 0,07$ g/día, mientras que el consumo correspondiente a animales realimentados luego de un ayuno, aumentó significativamente y se mantuvo elevado hasta el quinto día del periodo de realimentación (**Figura 5A**). El consumo de alimento acumulado desde el día 1 al día 5 de realimentación fue de $24,07 \pm 0,58$ g (**Figura 5B**), con un promedio de $4,86 \pm 0,09$ g/día. Alternativamente, si el consumo de alimento acumulado desde el día 1 al día 5 lo dividimos por siete, es decir el periodo de realimentación más los dos días del periodo de ayuno, da un promedio de $3,48 \pm 0,90$ g/día, que no difiere del promedio diario de un animal alimentado *ad libitum*. Además, evaluamos el peso corporal diario de los ratones pertenecientes a ambos grupos experimentales (**Figura 5C**), observándose una disminución del $23,56 \pm 0,91$ % del peso corporal basal al finalizar el periodo de ayuno, el cual se recuperó completamente al tercer día del periodo de realimentación (**Figura 5C**).

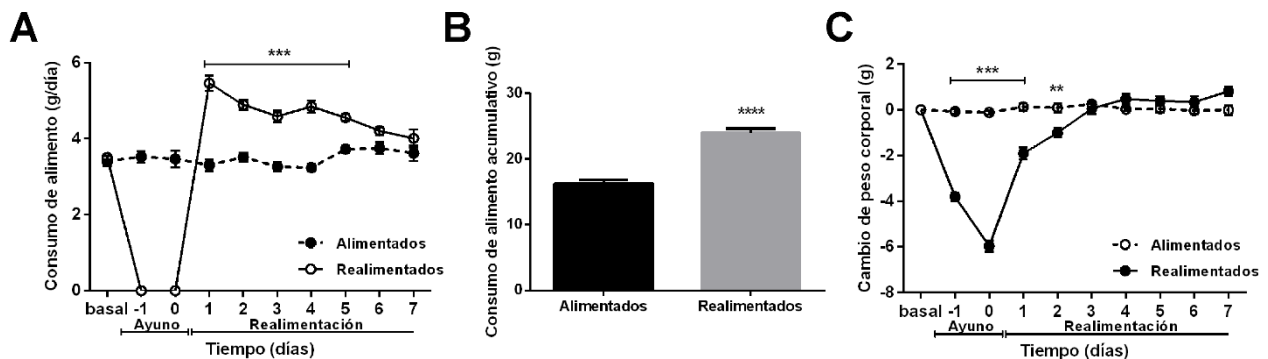


Figura 5: Análisis del patrón de consumo de alimento y peso corporal durante el protocolo de ayuno-realimentación. (A y C) Cambios en el consumo de alimento y el peso corporal, respectivamente, en ratones WT mantenidos *ad libitum* con dieta estándar (n=9) o ayunados por 2 días y luego realimentados a las 10:00 hs (n=17). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de dos vías usando la prueba *post-hoc* de Bonferroni. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ vs grupo alimentado el mismo día. (B) Consumo de alimento acumulado entre los días 1 y 5 del periodo de realimentación. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. ****, $p < 0,0001$ vs grupo alimentado.

En un experimento independiente, estudiamos la ingesta de alimento en un grupo de ratones en forma automatizada en jaulas metabólicas y encontramos que el incremento del consumo diario de alimento fue significativamente mayor hasta el día 5 de realimentación, datos que corroboraron los obtenidos con los métodos manuales de pesada. El sistema automatizado, a su vez, mostró que el consumo de alimento diario de ratones alimentados *ad libitum* ocurre principalmente durante el ciclo de oscuridad ($86,2 \pm 0,6\%$ del consumo de alimento diario total) y que ese patrón no se modificó durante el estudio (**Figura 6A**). El consumo de alimento diario de los ratones realimentados luego de un ayuno no solo aumentó, sino que también cambió su patrón (**Figura 6A**). En este sentido, el consumo de alimento

durante la fase de luz de ratones realimentados aumentó durante los primeros 6 días de realimentación (**Figura 6B**), mientras que el consumo durante la fase oscura disminuyó durante el mismo periodo (**Figura 6C**), en comparación con el consumo de alimento de los animales alimentados.

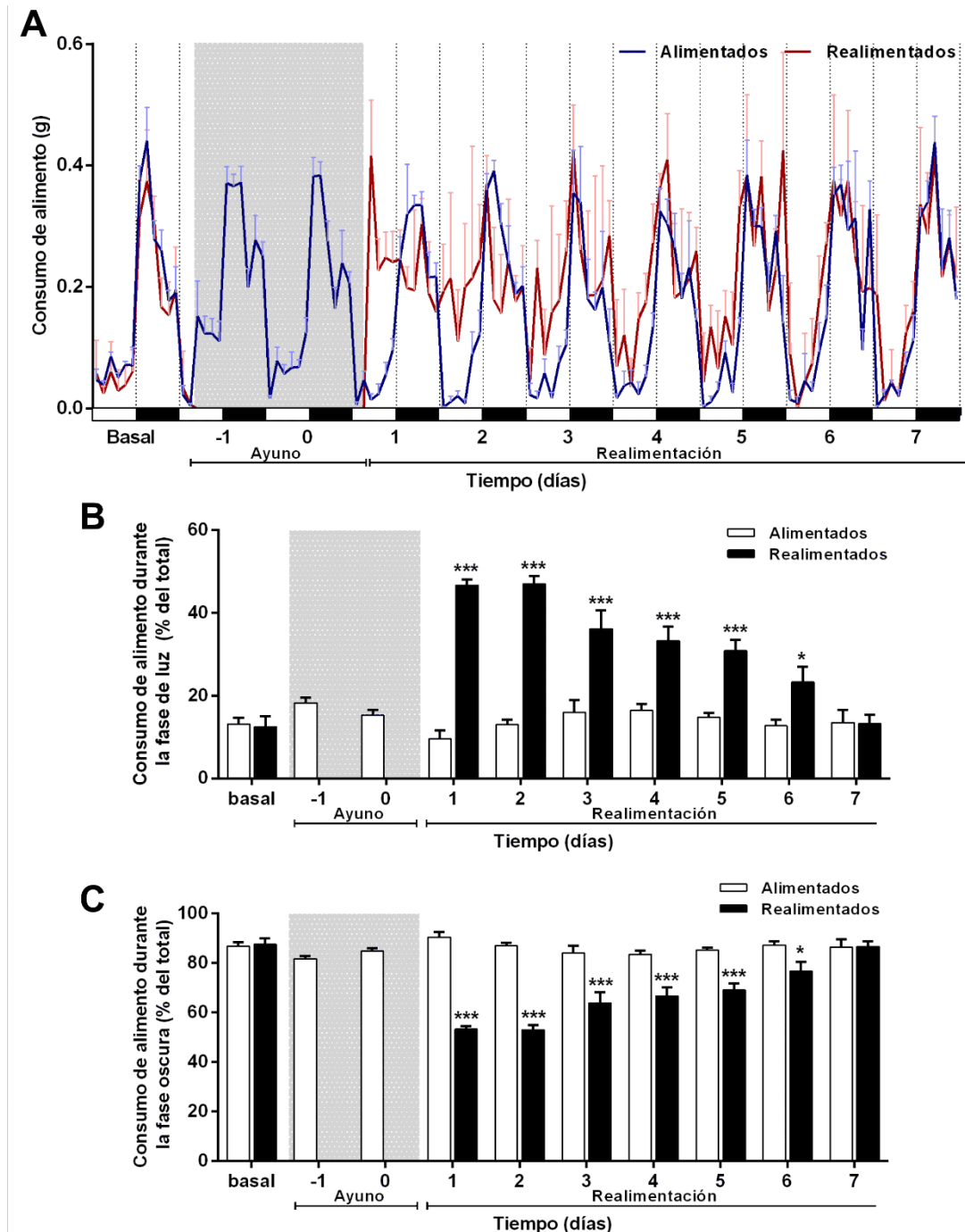


Figura 6: Análisis del patrón de consumo de alimento en jaulas metabólicas durante el protocolo de ayuno-realimentación. (A) Patrón diario de alimentación monitoreado usando cajas automáticas de alimentación/actividad (TSE system, GmbH). Las fases de luz y oscuridad se denotaron a través de rectángulos blancos y oscuros, respectivamente, sobre el eje x. (B y C) Porcentajes del consumo de alimento durante la fase de luz y oscura, respectivamente (n=4 ratones WT alimentados y n=4 ratones WT realimentados). El periodo de ayuno se esquematizó a través de un rectángulo gris sobre los gráficos. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de dos vías usando la prueba *post-hoc* de Bonferroni. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ vs grupo alimentado el mismo día.

De forma complementaria al monitoreo automático de los patrones de alimentación, medimos la actividad locomotora en los mismos animales experimentales. Los animales alimentados *ad libitum* presentaron un patrón nocturno de actividad correspondiente a un $84,2 \pm 1,0$ % del total de la actividad diaria (**Figura 7A-B**). Los animales que fueron ayunados y realimentados cambiaron su patrón de actividad locomotora, que se manifestó con un aumento de la actividad en la fase de luz ($p < 0,0001$) sin alcanzarse la significancia estadística en la actividad total diaria ($p = 0,1202$, ANOVA de dos vías con prueba *post-hoc* de Bonferroni). Finalmente, los ratones que fueron ayunados y posteriormente realimentados presentaron hipoactividad durante los primeros 3 días de realimentación, que se evidenció principalmente en la fase de oscuridad (**Figura 7C**).

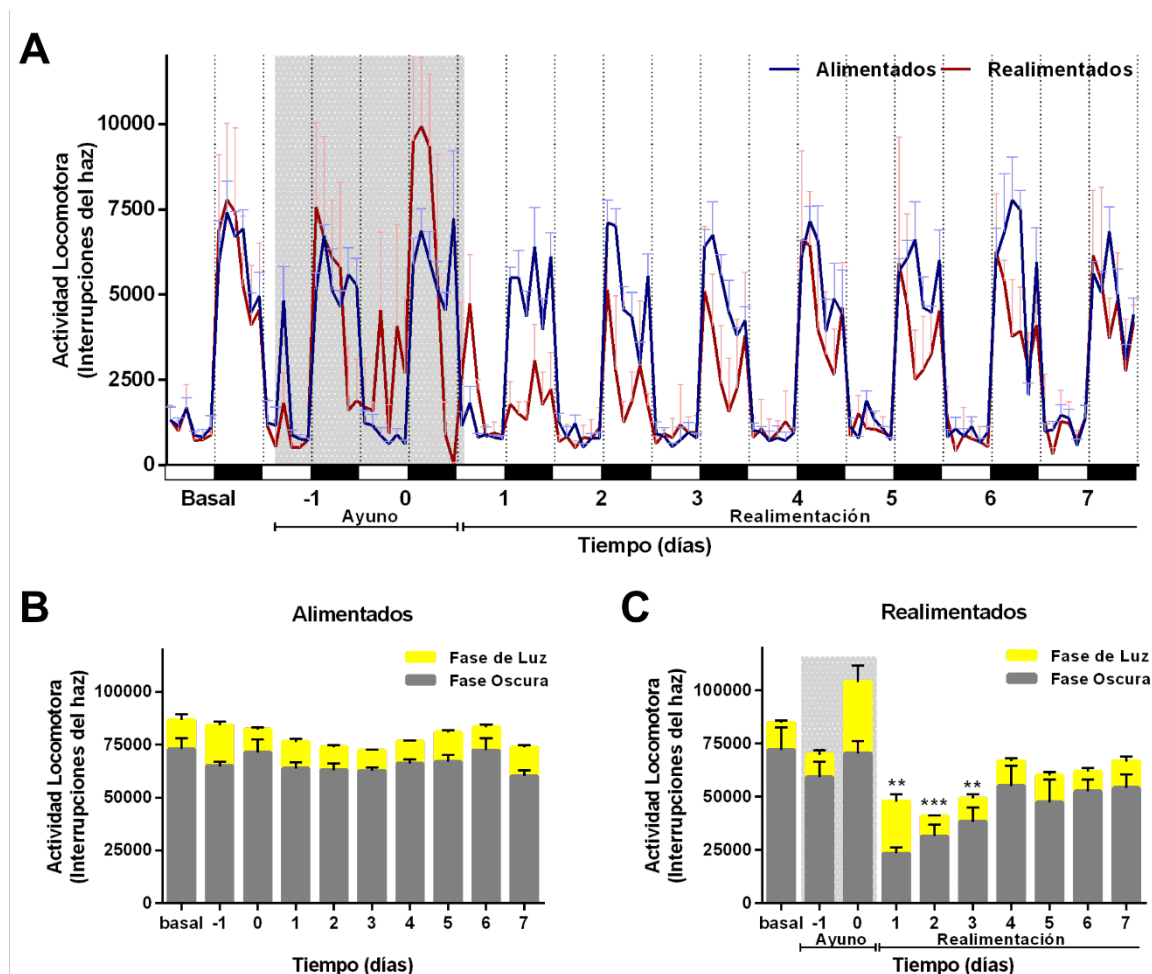


Figura 7: Análisis del patrón de actividad locomotora durante el protocolo de ayuno-realimentación. Patrón diario de actividad locomotora monitoreado usando cajas automáticas de alimentación/actividad (*TSE system, GmbH*). Las fases de luz y oscuridad se muestran a través de rectángulos blancos y oscuros sobre el eje x. (**B y C**) Actividad locomotora durante la fase de luz (amarillo) y oscura (gris) en el grupo alimentado y realimentado, respectivamente ($n=4$ para cada grupo). El periodo de ayuno se esquematizó a través de un rectángulo gris sobre los gráficos. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de dos vías usando la prueba *post-hoc* de Bonferroni. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ vs actividad locomotora total basal.

b) Influencia del balance energético negativo sobre el sistema ghrelina/GHSR

Luego, estudiamos el impacto que genera el protocolo de ayuno-realimentación sobre los niveles plasmáticos de ghrelina y la expresión hipotalámica de GHSR.

Los niveles plasmáticos de ghrelina y de DAG aumentaron $1,9 \pm 0,5$ y $1,8 \pm 0,3$ veces respectivamente, en animales ayunados respecto a los animales alimentados, retornando a los valores basales al segundo día de realimentación (**Figura 8A-B**). Este aumento de ghrelina durante el ayuno coincidió con la disminución de la glucosa y de los triglicéridos plasmáticos característicos de un ayuno ($66,6 \pm 8,1$ % y $74,2 \pm 8,8$ % respecto al grupo alimentado, respectivamente), los cuales retornaron a los valores basales durante la realimentación (**Figura 8C-D**).

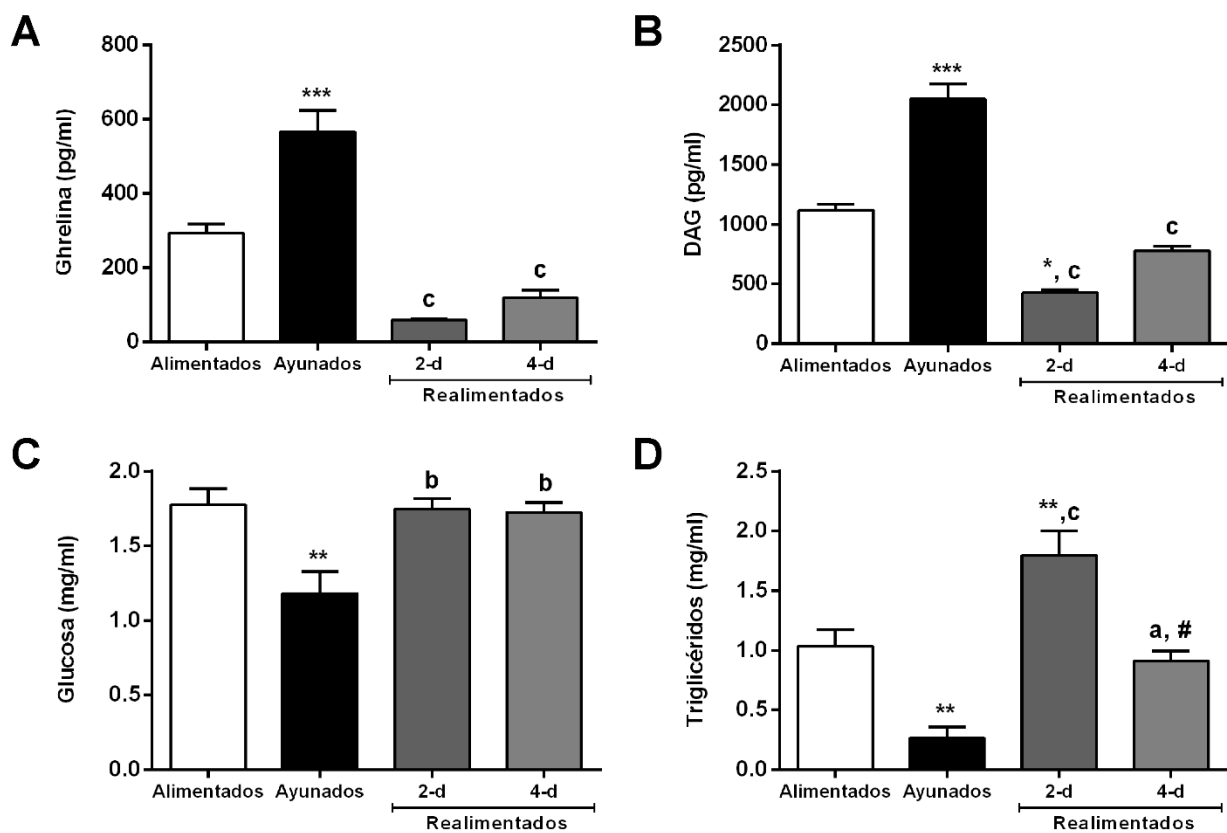


Figura 8: Niveles plasmáticos de ghrelina, DAG, glucosa y triglicéridos durante el protocolo de ayuno-realimentación. (A y B) Niveles plasmáticos de ghrelina y DAG, respectivamente, evaluados por un inmunoensayo enzimático específico ($n=6$ para cada grupo experimental). (C y D) Niveles plasmáticos de glucosa y triglicéridos, respectivamente ($n=6$ para cada grupo experimental). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de una vía usando la prueba *post-hoc* de Tukey. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ vs grupo alimentado; c $p<0,001$, b $p<0,01$ y a $p<0,05$ vs grupo ayunado; # $p<0,05$ vs grupo 2-d realimentado.

Los niveles del ARNm de GHSR en micro-disecciones del ARC de animales ayunados aumentaron $3,1 \pm 0,6$ veces respecto del grupo alimentado y disminuyeron nuevamente con la realimentación (**Figura 9A**). Para complementar el estudio, estimamos los niveles proteicos de GHSR utilizando F-ghrelina la cual inyectamos ICV en la mañana del día experimental. De esta manera, el estudio con F-ghrelina nos permitió estimar indirectamente la presencia de GHSR. Luego de 30 minutos post-inyección, anestesiábamos a los

ratones, los perfundimos, extrajimos sus cerebros y los cortamos para su examen al microscopio de fluorescencia. A pesar de que cubrimos las muestras con medio de montaje comercial, la fluorescencia de la F-ghrelina decayó muy rápidamente al cabo de unos minutos hasta desaparecer por completo. Por esta razón, y con el fin de estabilizar la señal fluorescente y aumentar la sensibilidad del sistema realizamos una IHQ cromogénica contra fluoresceína y observamos la señal al microscopio óptico de campo claro. El análisis de unión de la F-ghrelina nos permitió distinguir la presencia de GHSR tanto en cuerpos celulares como en señal punteada que compatibiliza con un perfil pre-sináptico. El número de cuerpos celulares fluoresceína+ en el ARCvm fue similar en todos los grupos experimentales ($\sim 168 \pm 20$ células/sección/lado) no observando diferencias en cuanto al tamaño y forma de las células fluoresceína+. En cuanto a la densidad de señal punteada fluoresceína+ dentro del ARC, encontramos un incremento de $3,8 \pm 0,6$ veces en los animales ayunados respecto al grupo alimentado, disminuyendo a los 2 días de realimentación pero permaneciendo aún elevada en comparación a la densidad de señal punteada de los animales alimentados. Finalmente, al cabo de 4 días de realimentación los niveles retornaron a los observados en el grupo de animales alimentados (**Figura 9B-C**).

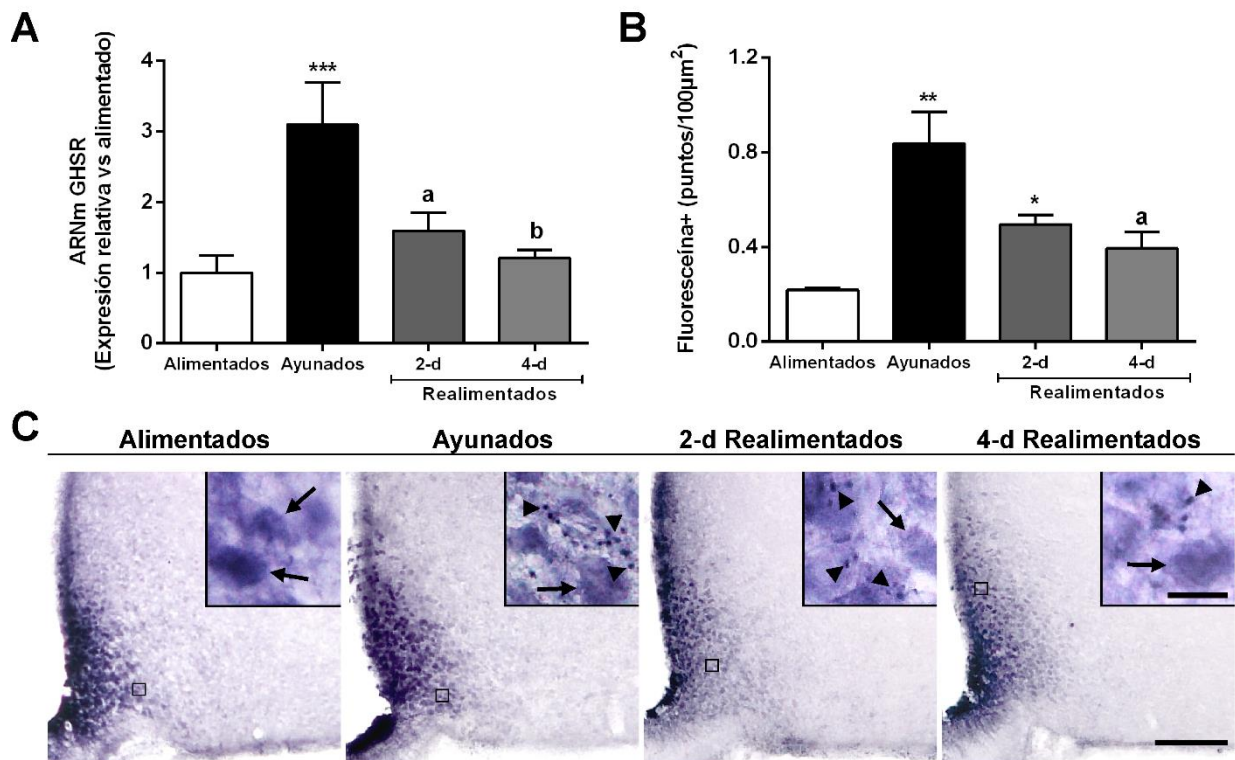


Figura 9: Cambios en GHSR durante el protocolo de ayuno-realimentación. (A) Valores comparativos del ARNm de GHSR relativo al gen de la proteína ribosomal L19, en micro-disecciones de ARC obtenidos de cada grupo experimental (n=6 por grupo). (B) Análisis del número de señal punteada fluoresceína+ por unidad de área en el ARC de cada grupo experimental. (C) Microfotografías representativas de la señal fluoresceína+ en secciones coronales del ARC de ratones WT inyectados ICV con F-ghrelina que fueron sujetas a una IHQ contra fluoresceína (señal negro/violeta) (n=4-7 por grupo). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas y las puntas de flecha señalan los somas y puntos fluoresceína+, respectivamente. Barras de escala: 100 y 10 µm para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de una vía usando la prueba *post-hoc* de Tukey. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ vs grupo alimentado; c $p < 0,001$, b $p < 0,01$ y a $p < 0,05$ vs grupo ayunado.

c) Influencia del balance energético negativo sobre los principales neuropéptidos del ARC

Las neuronas NPY/AgRP expresan altos niveles de GHSR y son un blanco clave en la señalización de la ghrelina. Por lo tanto, evaluamos si el ayuno induce cambios en la biosíntesis de los principales neuropéptidos del ARC.

Los niveles de ARNm de NPY en micro-disecciones del núcleo ARC aumentaron $11,1 \pm 2,9$ veces en ratones ayunados en comparación con los ratones alimentados. Luego de 2 días de realimentación, los niveles de ARNm de NPY continuaron $6,4 \pm 1,1$ veces elevados respecto al grupo alimentado, mientras que a los 4 días de realimentación estos niveles retornaron a los valores basales (**Figura 10A**). En cuanto a la inmuno-reactividad para NPY, observamos que la mayoría de la señal-IR presentó una localización dendrítica, observándose muy pocos cuerpos neuronales en el ARC de un animal alimentado. Sin embargo, el número de células NPY+ incrementó $46,4 \pm 4,3$ veces en el ARC de los animales ayunados respecto al grupo alimentado y luego comenzó a disminuir paulatinamente a los 2 y 4 días de realimentación respecto del grupo ayunado, aunque permaneciendo $23,5 \pm 3,7$ y $7,7 \pm 1,4$ veces elevado, respectivamente, respecto de los valores observados en el grupo alimentado (**Figura 10B-C**). Luego de 6 días de realimentación, el número de células NPY+ en el ARC fue similar al cuantificado en el grupo de animales alimentados. Adicionalmente, los niveles de ARNm de AgRP en micro-disecciones del núcleo ARC aumentaron $11,3 \pm 2,3$ veces en animales ayunados en comparación con los animales alimentados, los cuales luego de 2 días de realimentación, continuaron $3,6 \pm 0,7$ veces elevados respecto al grupo alimentado, retornando a los valores basales a los 4 días de realimentación.

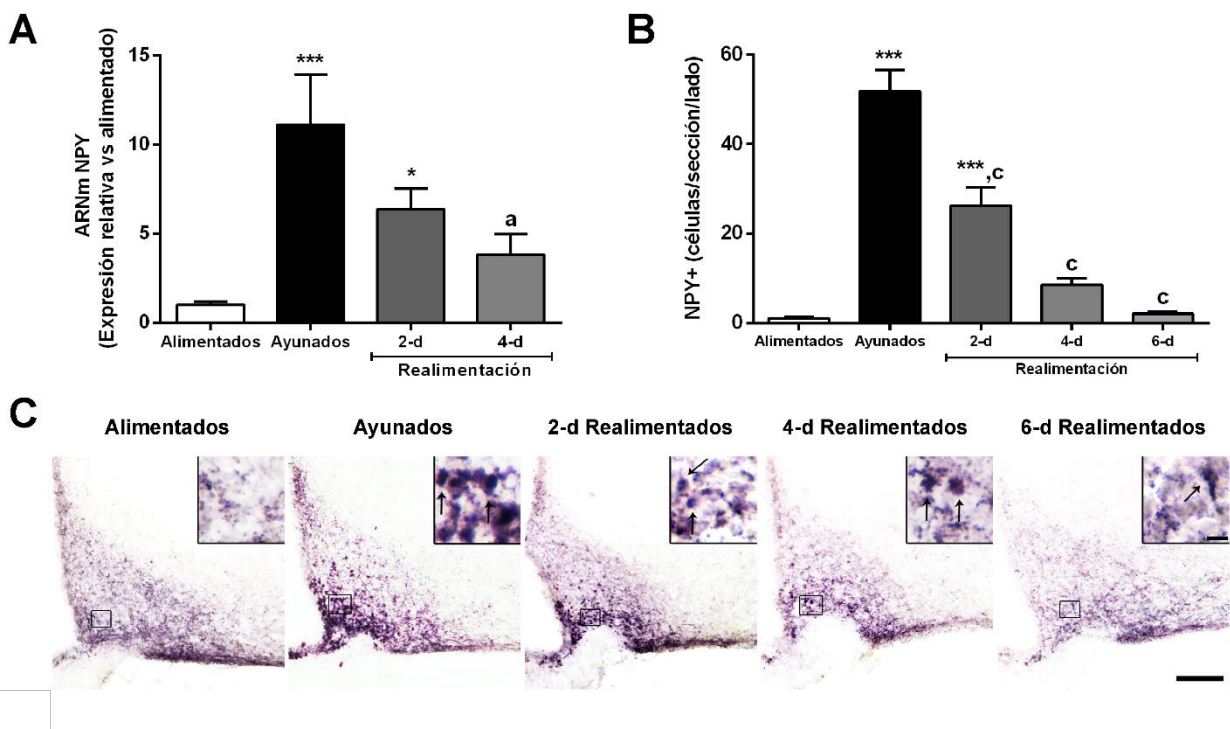


Figura 10: Niveles de NPY en el ARC luego de un evento de ayuno. (A) Valores comparativos del ARNm de NPY relativo al gen de la proteína ribosomal L19 en micro-disecciones de ARC obtenidos de cada grupo experimental (n=6 por grupo). (B) Análisis cuantitativo del número de células NPY+ en el ARC de cada grupo experimental (n=5-8 por grupo). (C) Microfotografías representativas de secciones coronales de ARC de ratones pertenecientes a cada grupo experimental sujetos a una IHQ contra NPY. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células NPY+. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. Los datos representaban la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de una vía usando la prueba *post-hoc* de Tukey y Games–Howell, respectivamente. *** p<0,001, * p<0,05 vs grupo alimentado; c p<0,001 y a p<0,05 vs grupo ayunado.

Aunque las neuronas POMC no expresan GHSR, la ghrelina tendría un efecto inhibitorio indirecto sobre estas neuronas a través de la liberación local de GABA de las neuronas NPY/AgRP (Cowley et al., 2003, Yu et al., 2017). Por lo tanto, evaluamos la producción de POMC en el protocolo de ayuno-realimentación utilizado. Los niveles de ARNm y el número de células POMC+ en el ARC disminuyeron $0,5 \pm 0,1$ y $0,5 \pm 0,1$ veces, respectivamente, en los ratones ayunados respecto de los alimentados, y retornaron a los valores basales con la realimentación (Figura 11A-C).

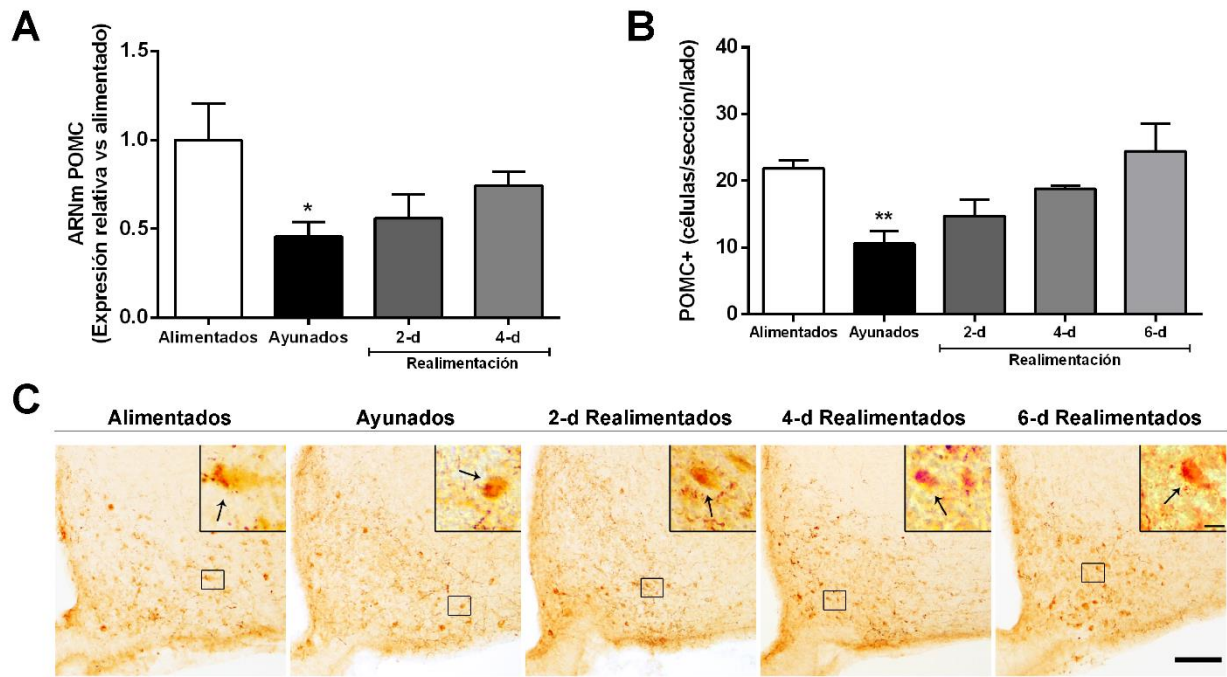


Figura 11: Niveles de POMC en el ARC luego de un evento de ayuno. (A) Valores comparativos del ARNm de POMC relativo al gen de la proteína ribosomal L19 en micro-disecciones de ARC obtenidos de cada grupo experimental (n=6 por grupo). (B) Análisis cuantitativo del número de células POMC+ en el ARC de cada grupo experimental (n=5-8 por grupo). (C) Microfotografías representativas de secciones coronales de ARC de ratones pertenecientes a cada grupo experimental sujetos a una IHQ contra POMC. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células POMC+. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de una vía usando la prueba *post-hoc* de Tukey. ** p<0,01, * p<0,05 vs grupo alimentado.

d) Implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en las respuestas hiperfágicas compensatorias observadas luego de un ayuno

Para estudiar la implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la hiperfagia compensatoria observada luego de un ayuno, utilizamos dos estrategias complementarias: una genética, utilizando ratones deficientes de GHSR (GHSR(-/-)) y ratones *knock-out* para ghrelina (ghrelina KO), y una farmacológica, utilizando ratones WT tratados con moduladores específicos de la actividad de GHSR.

El consumo de alimento diario de los ratones GHSR(-/-) realimentados luego de un ayuno aumentó significativamente y se mantuvo elevado hasta el quinto día del periodo de realimentación al igual que lo observado anteriormente en animales WT bajo el mismo protocolo (**Figura 12A**). Sin embargo, el consumo de alimento acumulado entre el día 1 y 5 de realimentación disminuyó un $14,4 \pm 3,5$ % respecto de sus hermanos WT (**Figura 12B**). Los pesos corporales de los animales GHSR(-/-) y WT no difirieron a lo largo del experimento (**Figura 12C**).

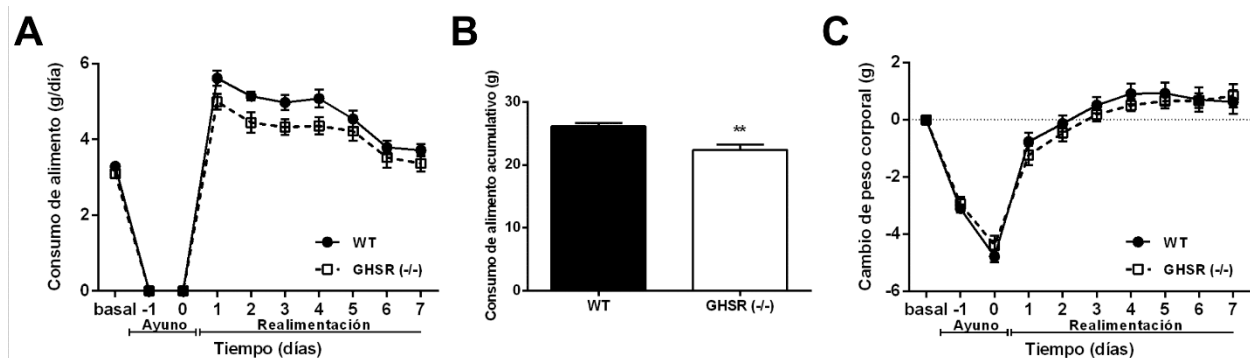


Figura 12: Implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en las respuestas compensatorias hiperfágicas observadas luego de un ayuno. **(A y C)** Cambios en el consumo de alimento y peso corporal, respectivamente, de ratones WT (n=15) y GHSR(-/-) (n=11) durante el protocolo de ayuno-realimentación descrito en la **Figura 4** de la sección "Materiales y Métodos". Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de dos vías. **(B)** Consumo de alimento acumulado entre los días 1 y 5 del periodo de realimentación de ratones WT y GHSR(-/-), respectivamente. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. ** $p < 0,01$ vs animales WT.

Posteriormente estudiamos si ocurren cambios en los valores del marcador de activación neuronal c-Fos y la biosíntesis de los principales neuropéptidos del ARC en este modelo genético. El número de células c-Fos+ en el ARC de animales GHSR(-/-) ayunados fue $2,6 \pm 0,2$ veces menor respecto del número de células c-Fos+ en el ARC de animales WT ayunados, los cuales a su vez presentaron un aumento de $11,5 \pm 1,0$ veces respecto a su control alimentado (**Figura 13A-B**). De la misma manera, el número de células NPY+ en el ARC de animales GHSR(-/-) ayunados fue $2,4 \pm 0,2$ veces menor respecto del hallado en el ARC de sus hermanos WT ayunados (**Figura 13C-D**), mientras que el número de células POMC+

disminuyó durante el ayuno de igual forma independientemente de la presencia de GHSR (**Figura 13E-F**).

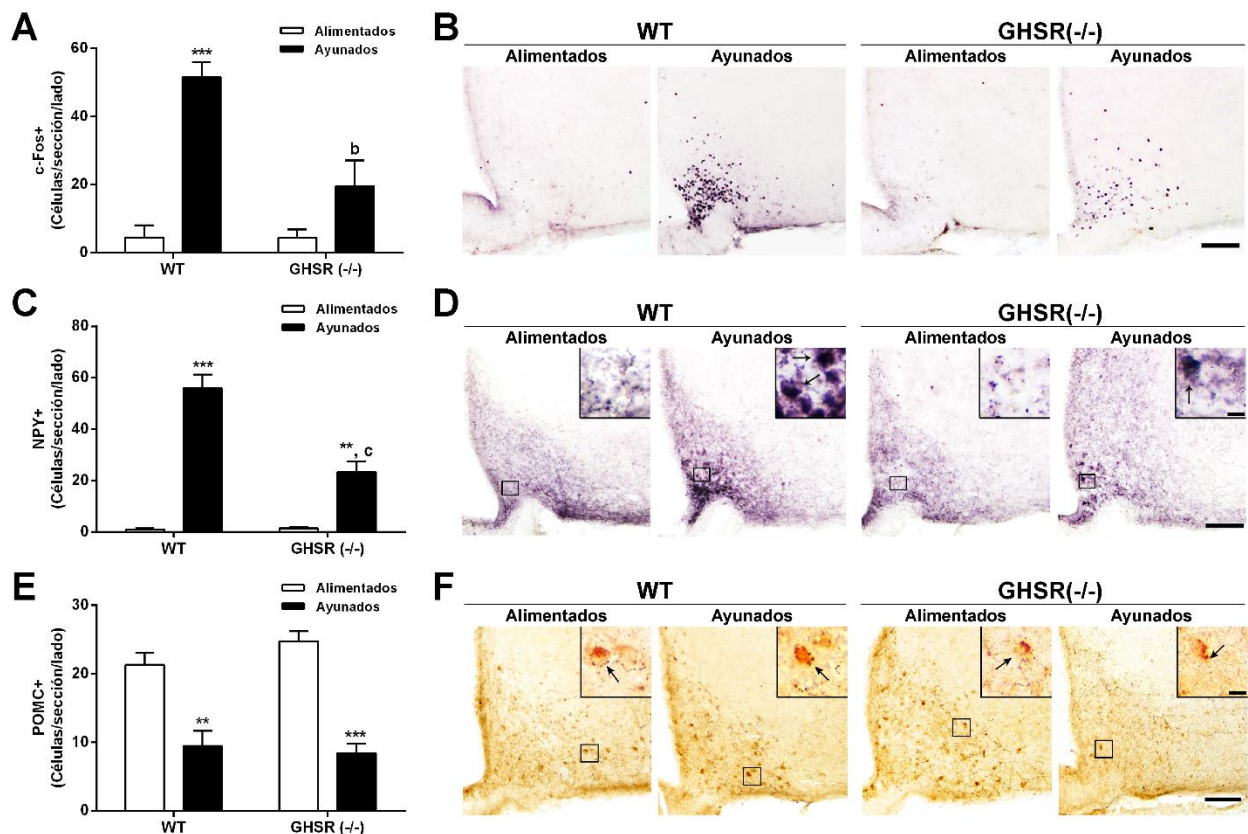


Figura 13: Implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación neuronal y en los niveles de NPY y POMC del ARC luego de un ayuno. **(A)** Análisis cuantitativo del número de células c-Fos+ en el ARC de cada grupo experimental (n=4-7). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,19)=7,908$, $p=0,0111$. **(C)** Análisis cuantitativo del número de células NPY+ en el ARC de cada grupo experimental (n=5-7). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,20)=20,27$, $p=0,0002$. **(E)** Análisis cuantitativo del número de células POMC+ en el ARC de cada grupo experimental (n=4-7). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,17)=1,648$, n.s. Genotipo: $F(1,17)=0,4529$, n.s. Condición experimental: $F(1,17)=65,45$, $p<0,0001$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Bonferroni. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ vs igual genotipo, distinta condición. c $p<0,001$, b $p<0,01$ vs igual condición, diferente genotipo. **(B, D, F)** Microfotografías representativas de secciones coronales de ARC de ratones pertenecientes a cada grupo experimental sujetos a una IHQ contra c-Fos, NPY y POMC, respectivamente. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células-IR para NPY y POMC, respectivamente. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente.

De manera complementaria, cruzamos ratones de la cepa NPY-GFP (van den Pol et al., 2009) con animales GHSR(-/-) generando animales GHSR(-/-)/NPY-GFP. El número de células GFP+ en el ARC de estos animales no se modificó con el ayuno ni con el genotipo (**Figura 14A-B**). Posteriormente, estimamos la actividad transcripcional de NPY a través de la cuantificación de la intensidad de señal GFP+ en el ARC, aumentando $3,23 \pm 0,24$ veces y $1,66 \pm 0,30$ veces en los animales NPY-GFP y GHSR(-/-)/NPY-GFP ayunados, respectivamente, en comparación con sus respectivos grupos alimentados (**Figura 14C**).

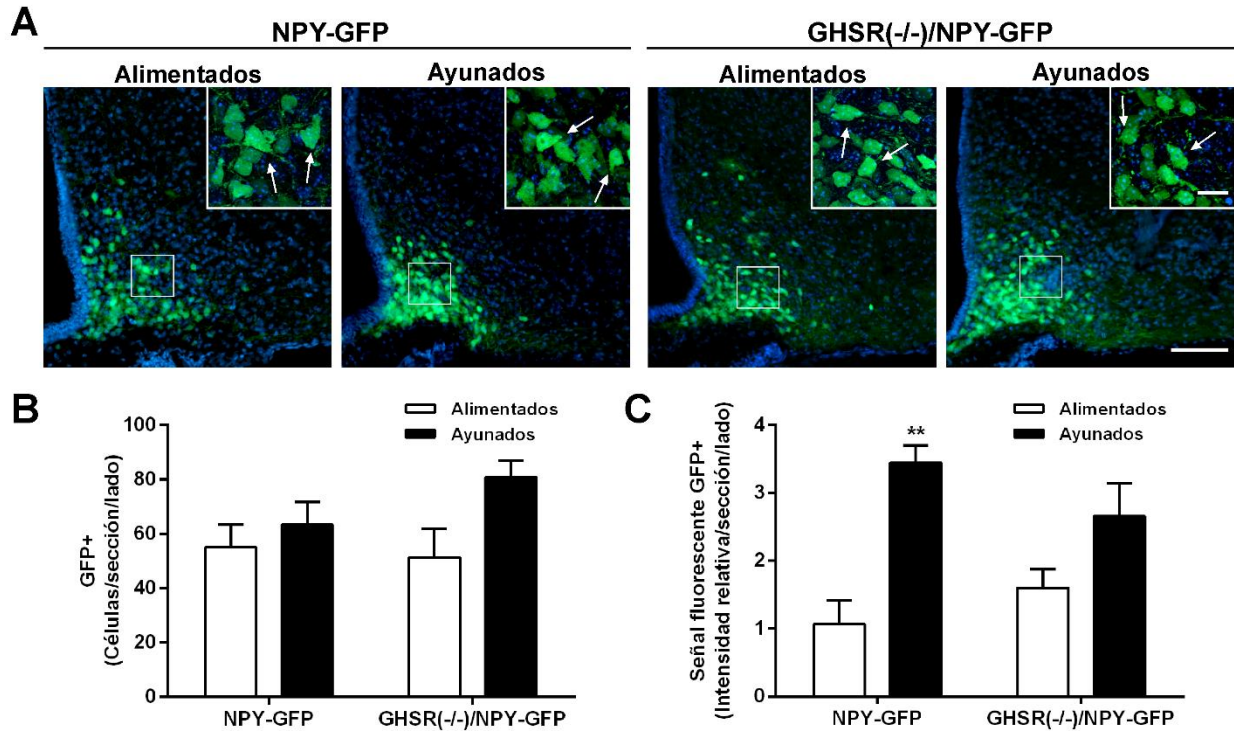


Figura 14: Implicancia de la señalización del sistema ghrelina/ GHSR en los niveles de NPY-GFP en el ARC luego de un evento de ayuno. (A) Microfotografías representativas de la señal fluorescente verde GFP+ de secciones coronales de ARC de ratones NPY-GFP y GHSR(-/-)/NPY-GFP alimentados y ayunados, respectivamente. La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células GFP+. Barras de escala: 100 y 20 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. (B) Análisis cuantitativo del número de células GFP+ en el ARC de cada grupo experimental (n=4-8). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1, 9)=0,9534$, n.s. Genotipo: $F(1, 9)=0,4057$, n.s. Condición experimental: $F(1, 9)=3,057$, n.s. (C) Análisis cuantitativo de la intensidad de señal fluorescente GFP+ en el ARC de cada grupo experimental (n=4-8). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1, 13)=3,037$, n.s. Genotipo: $F(1, 13)=0,1122$, n.s. Condición experimental: $F(1, 13)=20,42$, $p=0,0006$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Bonferroni. ** $p<0,01$ vs igual genotipo, distinta condición.

Dado que las neuronas NPY del ARC co-expresan AgRP, podemos plantear la hipótesis que la expresión de ambos neuropéptidos podría estar regulada en paralelo durante el ayuno. Por lo tanto, cuantificamos AgRP en animales WT y GHSR(-/-) ayunados. El número de células AgRP+ aumentó $10,1 \pm 1,0$ veces en animales WT ayunados respecto de su grupo control alimentado, mientras que no se encontró un aumento significativo en el número de células AgRP+ en el ARC de los animales GHSR(-/-) ayunados (Figura 15A-B).

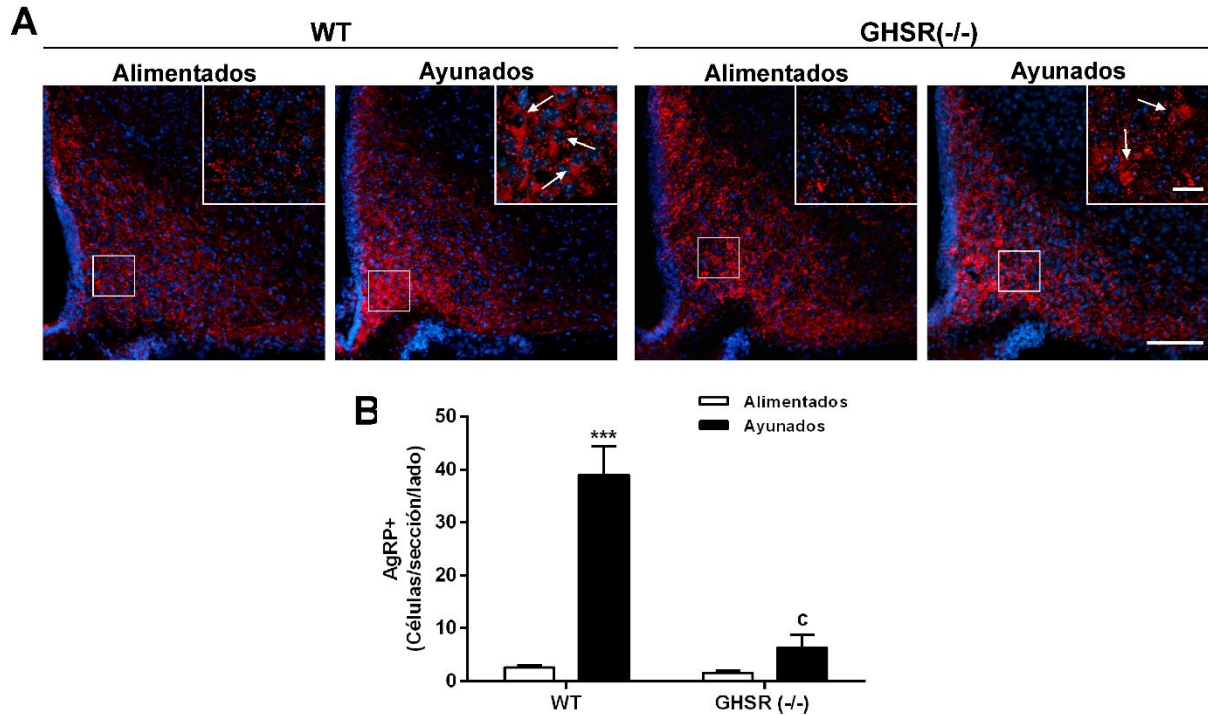


Figura 15: Implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en los niveles de AgRP en el ARC luego de un evento de ayuno. **(A)** Microfotografías representativas de la señal fluorescente roja de secciones coronales de ARC de ratones WT y GHSR(-/-) alimentados y ayunados, respectivamente, sujetas a una IHQ contra AgRP. La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células AgRP+. Barras de escala: 100 y 20 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. **(B)** Análisis cuantitativo del número de células AgRP+ en el ARC de cada grupo experimental (n=5-7). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1, 18)=10,06$, $p=0,0053$. Análisis *post-hoc* de Bonferroni. *** $p<0,001$ vs igual genotipo, distinta condición. c $p<0,001$ vs igual condición, diferente genotipo.

Hasta aquí, los resultados nos indicarían que el aumento de la actividad del sistema ghrelina/GHSR es necesario para que la hiperfagia compensatoria se manifieste completamente luego de un ayuno. Ahora bien, para intentar discernir si este aumento de la señalización se debe al aumento de ghrelina en plasma o al aumento de la señalización constitutiva de GHSR por el incremento de su expresión en el ARC, estudiamos la respuesta a un protocolo de ayuno-realimentación de animales ghrelina-KO y de ratones WT tratados con moduladores de la actividad de GHSR. Para los experimentos de bloqueo farmacológico utilizamos dos antagonistas específicos de GHSR (JMV-2959 y [D-Lys3]-GHRP-6), que bloquean la actividad evocada por la ghrelina, y un compuesto que además de ser antagonista posee actividad de agonista inverso (K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂), es decir, que bloquea la señalización del receptor independientemente de la ghrelina. La elección de las dosis utilizadas se basó en estudios previos que muestran su efectividad farmacológica como así también estudios propios realizados en nuestro laboratorio (ver sección de “Materiales y Métodos”). Las dosis testeadas de JMV-2959 y [D-Lys3]-GHRP-6 redujeron la ingesta de alimento respecto de la inducida por la administración central de ghrelina en un $72,0 \pm 5,0$ % ($p<0,0001$) y un $42,4 \pm 4,0$ % ($p<0,001$). Mientras que la dosis testeada de K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂: 1) reduce la ingesta nocturna durante la primera fase del período de oscuridad (de 18:00 a 23:00 hs) en ratones alimentados *ad libitum* cuando se administra la droga a las 18:00 hs ($160,0 \pm 41,3$ mg vs $595,0 \pm 71,7$ mg en los animales inyectados con vehículo, $p<0,001$), y 2) reduce la ingesta inducida por

administración central de ghrelina en un $81,0 \pm 5,6 \%$, $p < 0,0001$. Además, esta dosis no afectó la ingesta nocturna de ratones GHSR(-/-).

En este experimento realizamos las inyecciones cada 8-hs vía ICV durante el ayuno, comenzando a las 16:00 hs del primer día de ayuno y finalizando a las 8:00 hs del segundo día, recibiendo en total 6 inyecciones cada animal. Posteriormente los realimentamos y evaluamos la ingesta diaria de alimento y el peso corporal. Recurrimos a este protocolo de inyecciones seriadas para manipular al sistema durante la totalidad del periodo de ayuno. En estos experimentos encontramos que los animales ghrelina-KO (**Figura 16A-B**) y los animales WT tratados ICV con JMV-2959 o [D-Lys3]-GHRP-6 (**Figura 16C-D**) consumieron una cantidad de alimento similar durante la realimentación a la de los grupos controles de cada caso. El consumo de alimento diario de animales salvajes tratados ICV durante el ayuno con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ también aumentó durante la realimentación; sin embargo, el consumo acumulado durante estos días disminuyó un $14,8 \pm 3,8\%$ respecto del grupo control tratado con vehículo (**Figura 16E-F**).

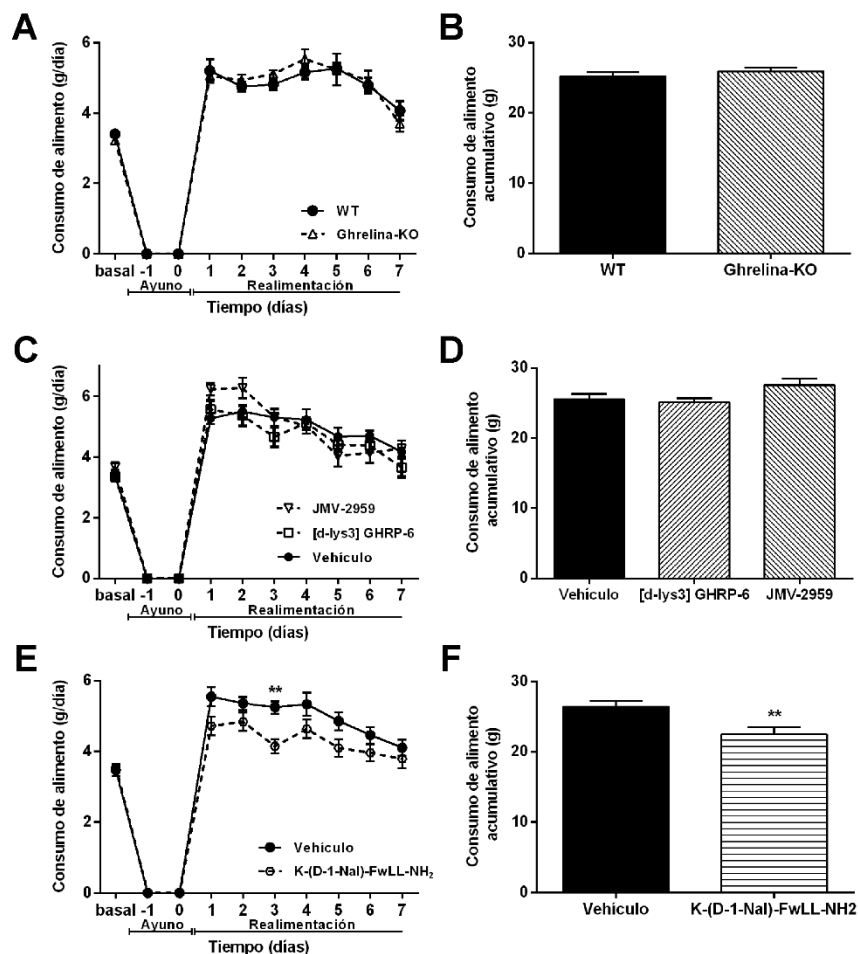


Figura 16: Estrategias genéticas y farmacológicas para estudiar el efecto de la actividad constitutiva o de la actividad ligando-evocada de GHSR en las respuestas hiperfágicas compensatorias observadas luego de un ayuno. (**A, C y E**) Cambios en el consumo de alimento de ratones WT (n=7) y ratones ghrelina-KO (n=4); ratones WT tratados ICV con vehículo (n=7) o con los antagonistas de GHSR [D-Lys3]-GHRP-6 (n=5) o JMV-2959 (n=8); y ratones WT tratados con vehículo (n=12) o con agonista inverso K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ (n=13), respectivamente. Los ratones fueron ayunados y realimentados como se describe en la **Figura 4** de la sección “Materiales y Métodos”. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de dos vías. a, $p < 0,05$ vs WT en el mismo día experimental. (**B, D y F**) Consumo de alimento acumulado durante los primeros 5 días de realimentación de ratones WT o ghrelina-KO; de ratones WT tratados ICV con vehículo, [D-Lys3]-GHRP-6 o JMV-2959; y ratones WT tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂, respectivamente. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t con corrección de Welch. **, $p < 0,01$ vs ratones WT tratados ICV con vehículo.

En un grupo independiente de ratones salvajes tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ o vehículo durante el periodo de ayuno, estudiamos el número de células NPY+, AgRP+ y c-Fos+ en el ARC. Los animales tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ mostraron un número de células menor tanto para NPY como para AgRP y una menor activación neuronal por la evaluación de c-Fos, en comparación con los animales tratados con vehículo (**Figura 17A-F**). Por lo tanto, los estudios llevados a cabo utilizando tanto herramientas genéticas como farmacológicas nos sugieren que la señalización del sistema ghrelina/GHSR es necesaria para desarrollar una hiperfagia compensatoria completa posterior a un ayuno.

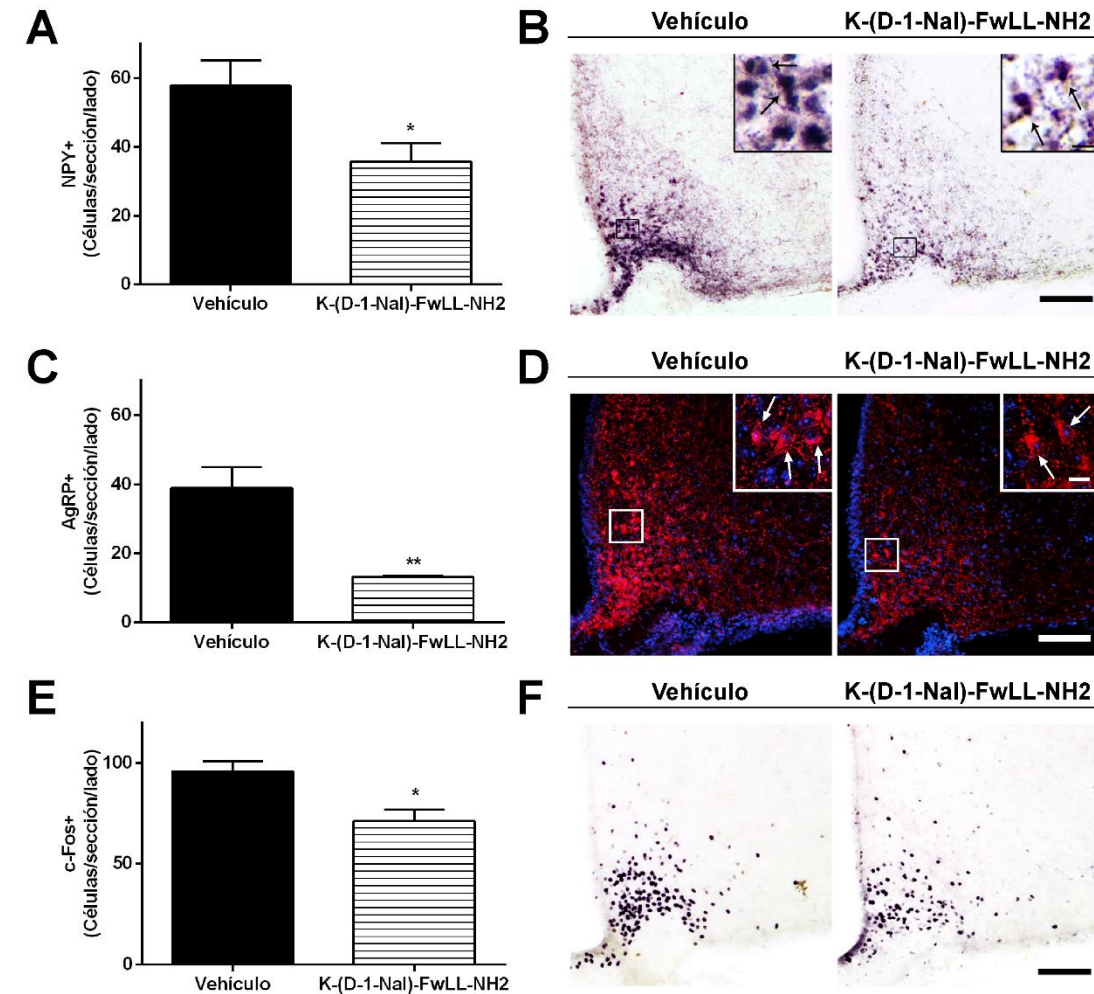


Figura 17: Efecto del péptido K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ en la activación neuronal y los niveles de NPY y AgRP del ARC luego de un ayuno. (A, C y E) Análisis cuantitativo del número de células NPY+, AgRP+ y c-Fos+ en el ARC de ratones WT tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂, respectivamente (n=6). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. **, p<0.01 y *, p<0.05 vs ratones WT tratados ICV con vehículo. (B, C y F) Microfotografías representativas de secciones coronales de ARC de ratones tratados ICV con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ durante el ayuno sujetas a una IHQ contra NPY, AgRP y c-Fos, respectivamente. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células NPY+ y AgRP+. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente.

CAPÍTULO 2
ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DE LA SEÑALIZACIÓN DEL
SISTEMA GHRELINA/GHSR EN LA ACTIVACIÓN DE LAS NEURONAS
CRF HIPOFISIOTRÓPICAS EN UNA CONDICIÓN DE AYUNO

a) Estudio de la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en una condición de ayuno

Como mencionamos previamente, nuestro laboratorio ha mostrado que la administración de ghrelina activa las neuronas hipofisiotrópicas productoras de CRF y que dichas neuronas carecen de GHSR. Dado que en situaciones de déficit energético el eje HHA se activa y tanto los niveles de ghrelina en plasma como los niveles de GHSR hipotalámico aumentan, en este segundo Capítulo de Tesis Doctoral estudiamos si dicho aumento en la señalización del sistema ghrelina/GHSR endógeno media la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas ante un evento de ayuno. Para esto, perfundimos ratones WT alimentados o ayunados, extrajimos sus cerebros, los cortamos y realizamos una IHQ contra CRF en una de las series de las secciones obtenidas. En ambos grupos experimentales encontramos que las neuronas CRF+ se localizan en todo el eje rostral-caudal del NPV, con un enriquecimiento de las mismas en la parte compacta del nivel medial del núcleo. Por otro lado, encontramos que el número de células CRF+ en el NPV de animales ayunados fue de $98,3 \pm 3,8$ células/sección/lado, aumentando $2,2 \pm 0,1$ veces respecto a las cuantificadas en los animales alimentados (**Figura 18A-B**). Posteriormente, estimamos la activación transcripcional de las neuronas CRF+ inducida por ayuno realizando IHQ dobles contra c-Fos y CRF en otra serie de las secciones de los mismos cerebros. El análisis cuantitativo indicó que un $82,3 \pm 5,8$ % de las células CRF+ en los animales ayunados fueron c-Fos+, mientras que no hubo células CRF+/c-Fos+ en el NPV de los animales alimentados (**Figura 18C-D**). En un experimento independiente, sacrificamos otro grupo de animales alimentados y ayunados para estudiar los niveles de corticosterona en plasma, encontrando un aumento de $3,7 \pm 0,3$ veces en los animales ayunados respecto de los niveles encontrados en los animales control ($26,6 \pm 2,2$ y $7,1 \pm 0,6$ ng/ml, respectivamente, $p < 0,001$). En conjunto, estos resultados indican que las neuronas CRF hipofisiotrópicas se activan durante el ayuno de 48 hs.

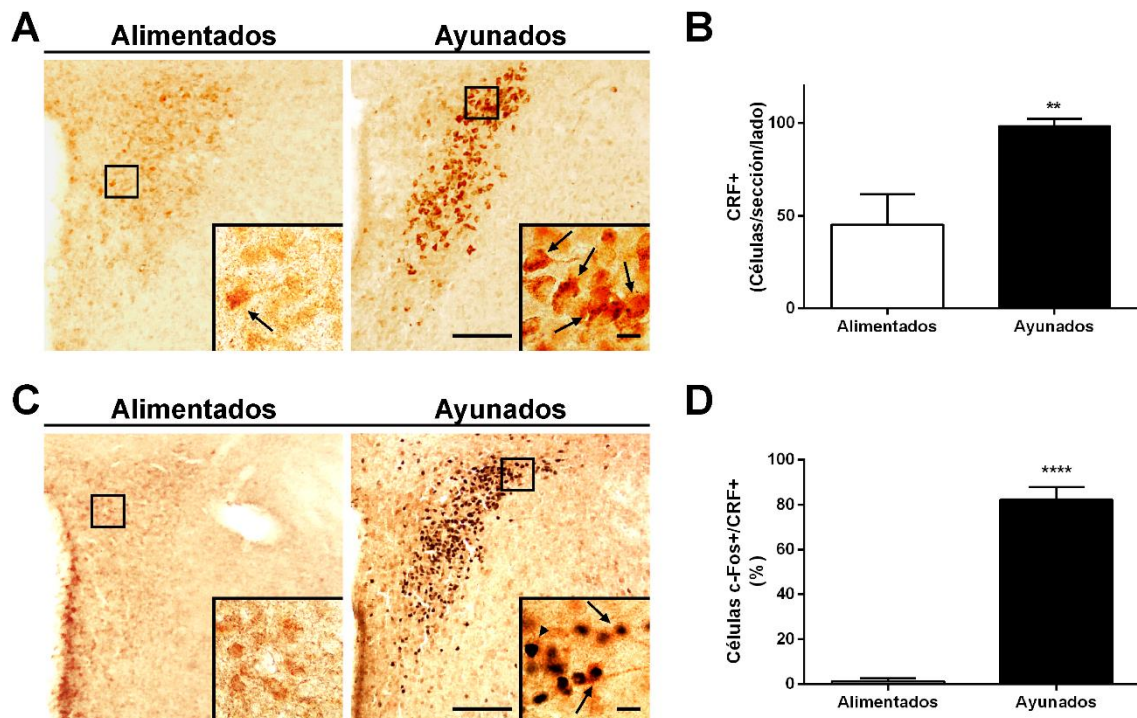


Figura 18: Activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas durante el ayuno. (A) Microfotografías representativas de la señal CRF+ en secciones coronales del NPV de ratones alimentados y ayunados, respectivamente, sujetas a una IHQ contra CRF (señal amarronada). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células CRF+. (B) Análisis cuantitativo del número de células CRF+ en el NPV de cada grupo experimental (n=4-6 por grupo). (C) Microfotografías representativas de la señal CRF+/c-Fos+ en secciones coronales del NPV de ratones alimentados y ayunados, respectivamente, sujetas a una IHQ doble contra CRF (señal amarronada) y c-Fos (señal negro/violeta). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células c-Fos+/CRF+, mientras que las puntas de flecha marcan las células c-Fos-/CRF-. (D) Análisis cuantitativo del porcentaje de células CRF+/c-Fos+ en el NPV de cada grupo experimental (n=6 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. **** p<0,0001 y ** p<0,01 vs animales alimentados.

b) Estudio de las innervaciones del NPV en una condición de ayuno

El NPV está fuertemente regulado por innervaciones provenientes del ARC, uno de los principales núcleos orquestadores del balance energético de los organismos. Dado que las neuronas NPY/AgRP del ARC inervan y activan a las neuronas CRF del NPV (Dimitrov et al., 2007), en el presente objetivo analizamos si las aferencias del ARC al NPV cambian con el ayuno.

En primer lugar, realizamos una IHQ contra NPY en secciones de cerebro de ratones alimentados *ad libitum* o ayunados y estimamos la immuno-reactividad en el NPV. Los resultados indicaron que la intensidad de señal NPY+ aumentó $2,1 \pm 0,2$ veces en los animales ayunados respecto del grupo control alimentado (**Figura 19A-B**). Estos datos correlacionan con el incremento tanto de los niveles del ARNm como de los niveles proteicos de este neuropéptido observados en el ARC (**Figura 10A-C**).

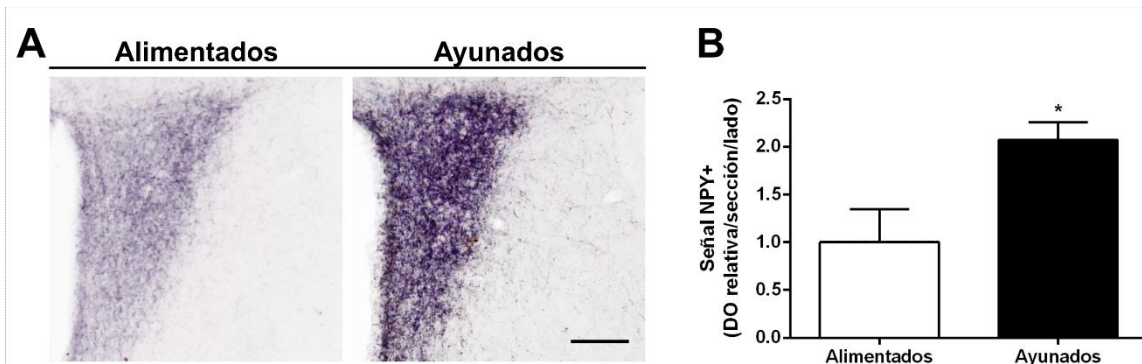


Figura 19: Intensidad de señal NPY+ en el NPV. (A) Microfotografías representativas de la señal NPY+ en secciones coronales del NPV de ratones alimentados y ayunados, respectivamente, sujetas a una IHQ contra NPY (señal violeta/negro) (n=4-6 por grupo). Barras de escala: 100 μ m. (B) Análisis cuantitativo de la intensidad de señal NPY+ en el NPV. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. * p<0,05 vs animales alimentados.

Dado que NPY no solo se produce en el ARC, realizamos una IHQ contra AgRP en otra serie de las secciones de cerebro de los mismos ratones. Es importante destacar que la producción de AgRP se encuentra restringida al ARC y, por lo tanto, da una estimación más certera de las innervaciones de las neuronas NPY/AgRP del ARC al NPV. Al realizar los análisis cuantitativos en microfotografías de alta magnificación, tanto la intensidad como la densidad de señal AgRP+ aumentaron $1,58 \pm 0,07$ y $2,36 \pm 0,25$ veces, respectivamente, en los animales ayunados respecto de los alimentados (**Figura 20A-C**). Adicionalmente, los cálculos de la densidad integrada en estas mismas secciones mostraron un aumento

más notorio en los animales ayunados (**Figura 20D**).

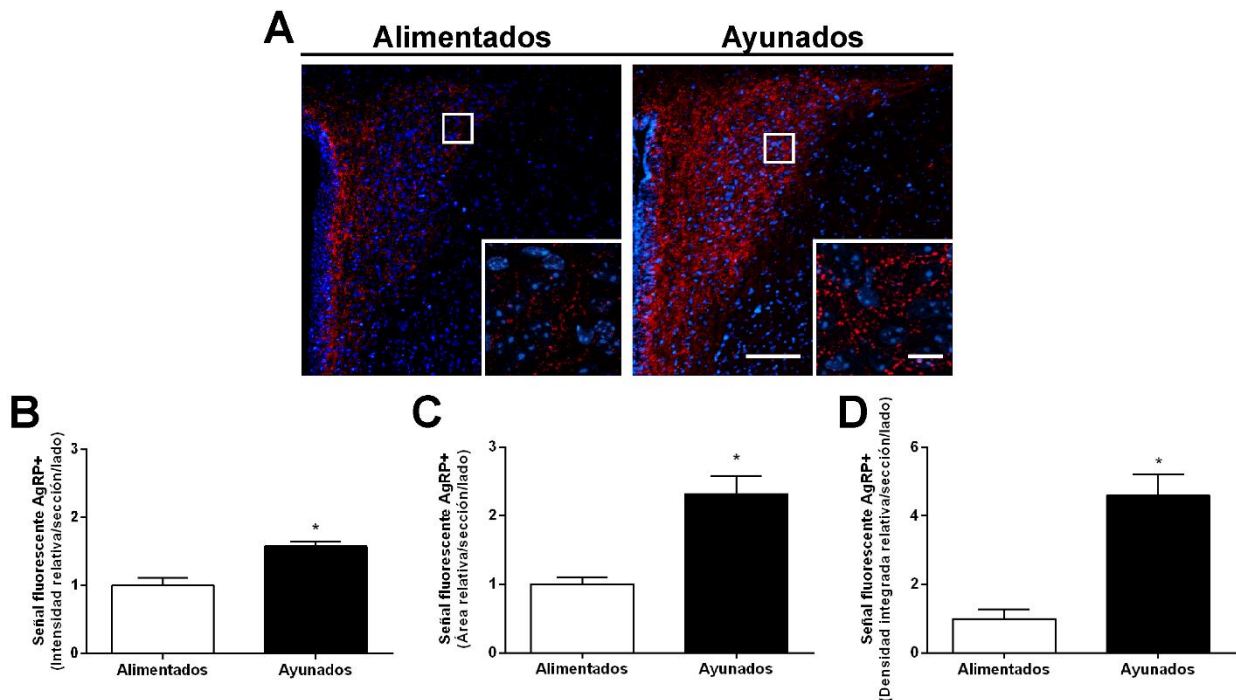


Figura 20: Intensidad, densidad y densidad integrada de la señal AgRP+ en el NPV. **(A)** Microfotografías representativas de la señal AgRP+ en secciones coronales del NPV de ratones alimentados y ayunados, respectivamente, sujetas a una IHQ fluorescente contra AgRP. La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. **(B, C y D)** Análisis cuantitativo de la intensidad, densidad y densidad integrada de la señal AgRP+ en el NPV, respectivamente (n=4 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. * $p < 0,05$ vs animales alimentados.

En contraposición a lo que ocurre en las neuronas NPY/AgRP del ARC, durante el ayuno disminuye la biosíntesis de POMC resultando en una menor visualización de células correspondientes a este fenotipo neuronal en el ARC (**Figura 11A-C**). Por lo tanto, utilizamos secciones de cerebro de ratones alimentados o ayunados para realizar una IHQ contra POMC y estimar la inmuno-reactividad en el NPV. Los resultados nos indicaron que la condición de ayuno no afectó las invaciones de POMC al NPV.

El aumento en la intensidad y la densidad de las fibras AgRP+ en el NPV observado en el ayuno puede deberse a un aumento de la biosíntesis de neuropéptido *per se*, que comienza a detectarse en fibras provenientes del ARC pre-existentes, o a la presencia de nuevas invaciones desde el ARC. Con el fin de discriminar entre estas dos posibilidades, recurrimos a la cepa de ratón NPY-GFP. A diferencia del número de neuronas AgRP+ en el ARC, el número de neuronas GFP+ no difiere entre ratones NPY-GFP alimentados y ayunados, encontrándose solamente un aumento en la intensidad de señal GFP+ en este núcleo (**Figura 14A-B**). Esto sugiere que todas las neuronas NPY son íntegramente visualizadas en dichos animales, independientemente si están alimentados o ayunados. Basado en esto, los análisis correspondientes en el NPV de animales NPY-GFP indicaron que tanto la intensidad como la densidad de señal GFP+ aumentaron en los animales ayunados en comparación con el grupo alimentado ($2,43 \pm 0,12$ y $1,69 \pm 0,17$ veces, respectivamente) (**Figura 21A-C**), sugiriendo un aumento en la cantidad de nuevas

inervaciones de las neuronas NPY/AgRP hacia el NPV en el ayuno.

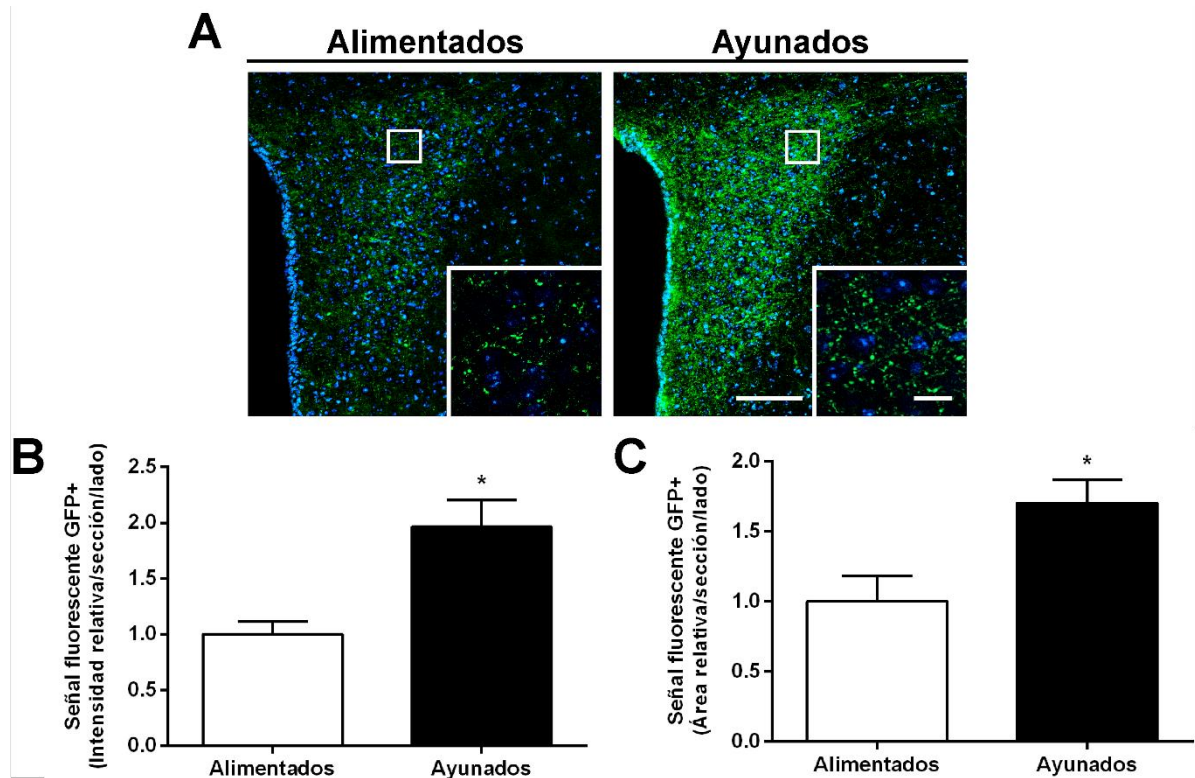


Figura 21: Intensidad y densidad de señal GFP+ en el NPV. (A) Microfotografías representativas de la señal fluorescente verde GFP+ de secciones coronales de NPV de ratones NPY-GFP alimentados y ayunados, respectivamente. La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Barras de escala: 100 y 10 µm para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. (B y C) Análisis cuantitativo de la intensidad y de la densidad de señal GFP+ en el NPV, respectivamente (n=7-8). Los datos representan la media ± SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. * p<0,05 vs animales NPY-GFP alimentados.

c) Estudio de la implicancia de la integridad del núcleo ARC en la activación de las neuronas CRF y los cambios en las innervaciones de las neuronas NPY/AgRP al NPV

Dado que durante el ayuno la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas correlaciona con un incremento de las innervaciones NPY/AgRP procedentes del ARC, estudiamos la posible implicancia de este núcleo en la activación de las neuronas CRF en respuesta al ayuno. Para llevar a cabo este estudio, utilizamos ratones macho de 7 a 9 semanas de edad con una lesión neurotóxica del ARC. En este estudio, resultó sumamente importante respetar la edad experimental para evitar anomalías del balance energético. En efecto, la lesión del ARC no afectó el peso corporal ($22,00 \pm 0,87$ vs $22,29 \pm 0,77$ g en ratones con el ARC-intacto) ni el consumo nocturno de alimento ($3,39 \pm 0,21$ vs $3,60 \pm 0,39$ g en ratones ARC-intacto) a la edad en estudio. En primer lugar, evaluamos la extensión de la lesión mediante una coloración de Nissl la cual determinó que el glutamato monosódico produjo una lesión específica en el ARC, manteniéndose intacta la morfología del NPV y demás áreas cerebrales. En el análisis cuantitativo de la coloración de Nissl encontramos que los ratones tratados con glutamato monosódico presentaron

una disminución del número de células en el ARC ($19,06 \pm 3,50$ % respecto del valor de animales con ARC-intacto) (**Figura 22A-C**), mientras que el número de células en el NPV no resultó alterada (**Figura 22A-B**).

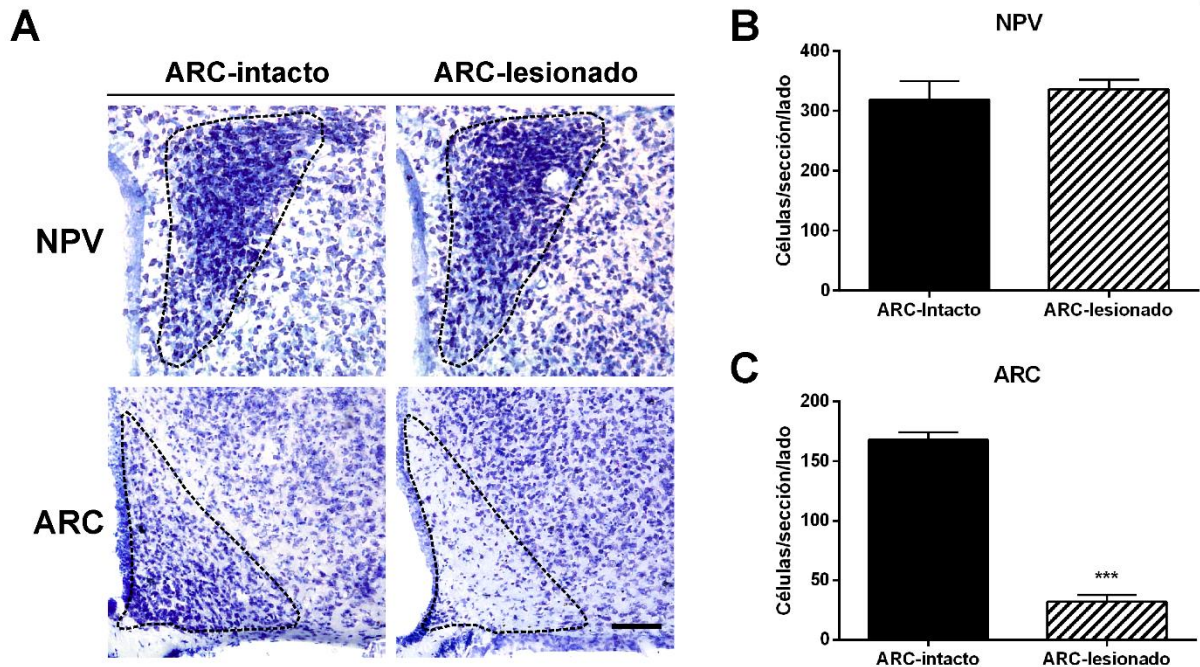


Figura 22: Tinción de Nissl del NPV y ARC de animales con el ARC-intacto y -lesionado. (A) Microfotografías representativas de secciones de cerebro de animales con el ARC-intacto y el ARC-lesionado sometidas a una tinción de Nissl. Los paneles superiores muestran el núcleo NPV y los inferiores el núcleo ARC. Barra de escala: 100µm. **(B y C)** Análisis cuantitativo del número de células del NPV y del ARC, respectivamente (n=7 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. *** $p < 0,001$ vs animales con el ARC-intacto.

Luego, cuantificamos la cantidad de células AgRP+ en el ARC de ambos grupos experimentales ayunados, encontrando una disminución del $89,35 \pm 4,98$ % en la cantidad de células AgRP+ en los animales con el ARC-lesionado respecto a las cuantificadas en los animales con el ARC-intacto. A su vez, y tal como se había mostrado en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral, los animales con el ARC-intacto ayunados mostraron un aumento en el número de células AgRP+ de $12,28 \pm 1,56$ veces respecto a su grupo control alimentado. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales alimentados (**Figura 23A-B**).

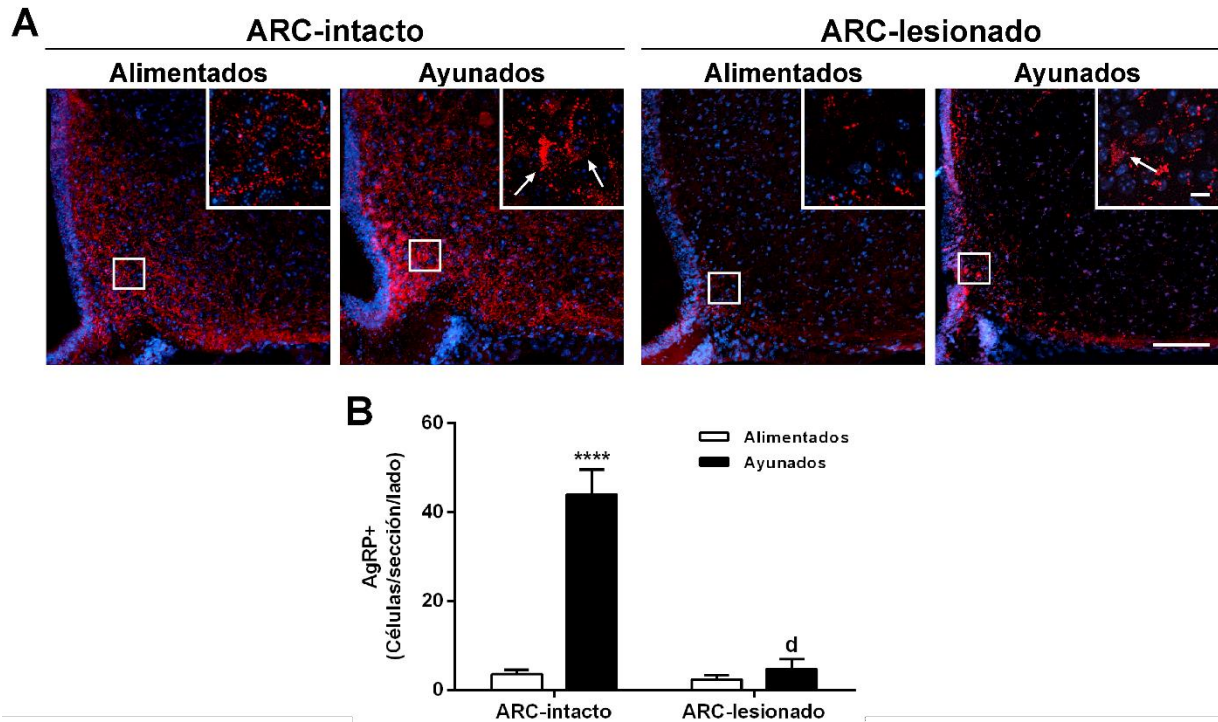


Figura 23: Número de células AgRP+ en el ARC de animales con el ARC-intacto y -lesionado. (A) Microfotografías representativas de la señal roja fluorescente de secciones coronales de ARC de ratones con el ARC-intacto y el ARC-lesionado sometidos o no a un ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra AgRP. La tinción azul corresponde al H&E, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células AgRP+. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. **(B)** Análisis cuantitativo del número de células AgRP+ en el ARC de cada grupo experimental (n=3-7 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados por ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,13)=12,79$, $p=0,0034$. Análisis *post-hoc* de Tukey. **** $p<0,0001$ vs igual tratamiento, distinta condición, d $p<0,0001$ vs igual condición, distinto tratamiento.

Posteriormente, analizamos las aferencias AgRP+ al NPV en estos mismos grupos experimentales, encontrando una disminución del $56,1 \pm 4,4$ % y del $75,3 \pm 4,6$ % en la intensidad y área de la señal AgRP+ en el NPV de los animales con el ARC-lesionado ayunados respecto de los animales con el ARC-intacto ayunados, respectivamente, no difiriendo entre ambos grupos alimentados. Además, el parámetro asociado a la densidad integrada en los animales con el ARC-intacto ayunados aumentó $4,73 \pm 0,86$ veces respecto a la obtenida en su grupo control alimentado, el cual no difirió de ambos grupos experimentales con el ARC-lesionado (**Figura 24A-D**). Por lo tanto, la lesión del ARC reduce el número de células AgRP+ en el ARC y sus aferencias al NPV, validando nuevamente la lesión realizada.

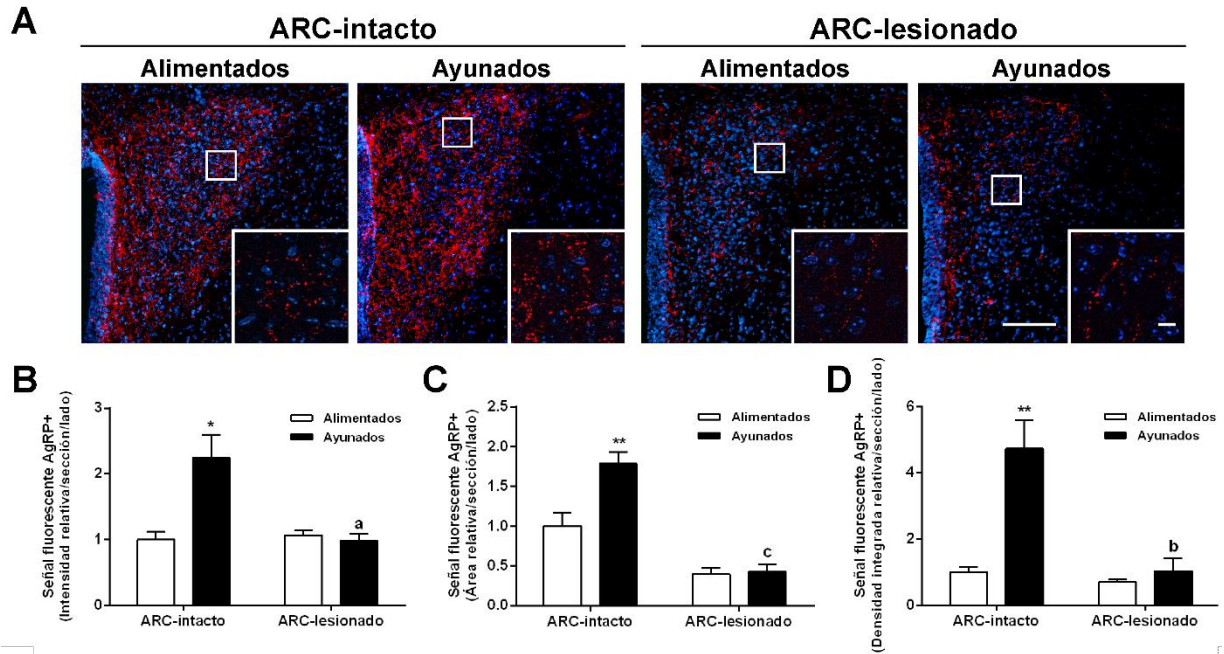


Figura 24: Intensidad, densidad y densidad integrada de señal AgRP+ en el NPV de animales con el ARC-intacto y -lesionado. (A) Microfotografías representativas de la señal roja fluorescente de secciones coronales de NPV de ratones WT con el ARC-intacto y el ARC-lesionado sometidos o no a un ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra AgRP (n=4-7 por grupo). La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Barras de escala: 100 y 10 µm para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. (B) Análisis cuantitativo de la intensidad de la señal AgRP+ en el NPV. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,15)=3,481$, n.s. Tratamiento: $F(1,15)=2,819$, n.s. Condición experimental: $F(1,15)=2,662$, n.s. (C) Análisis cuantitativo del área de señal AgRP+ en el NPV. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1, 17)=5,476$, $p= 0,0317$. (D) Análisis cuantitativo de la densidad integrada de señal AgRP+ en el NPV. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1, 18)=5,553$, $p=0,0300$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Tukey. ** $p<0,01$, * $p<0,05$ vs igual tratamiento, distinta condición; c $p<0,001$, b $p<0,01$ y a $p<0,01$ vs igual condición, distinto tratamiento.

Para determinar si las neuronas del ARC median la activación neuronal del NPV inducida por ayuno, evaluamos c-Fos en ambos núcleos hipotalámicos en ratones con el ARC-lesionado o -intacto sometidos o no a un ayuno. El análisis cuantitativo indicó que los animales con el ARC-lesionado ayunados presentaron una disminución del $86,7 \pm 8,7 \%$ y $94,6 \pm 1,6 \%$ en el número de células c-Fos+ en el NPV y en el ARC, respectivamente, en comparación con los animales con el ARC-intacto ayunados, no encontrándose ninguna diferencia entre ambos grupos experimentales alimentados (**Figura 25A-C**).

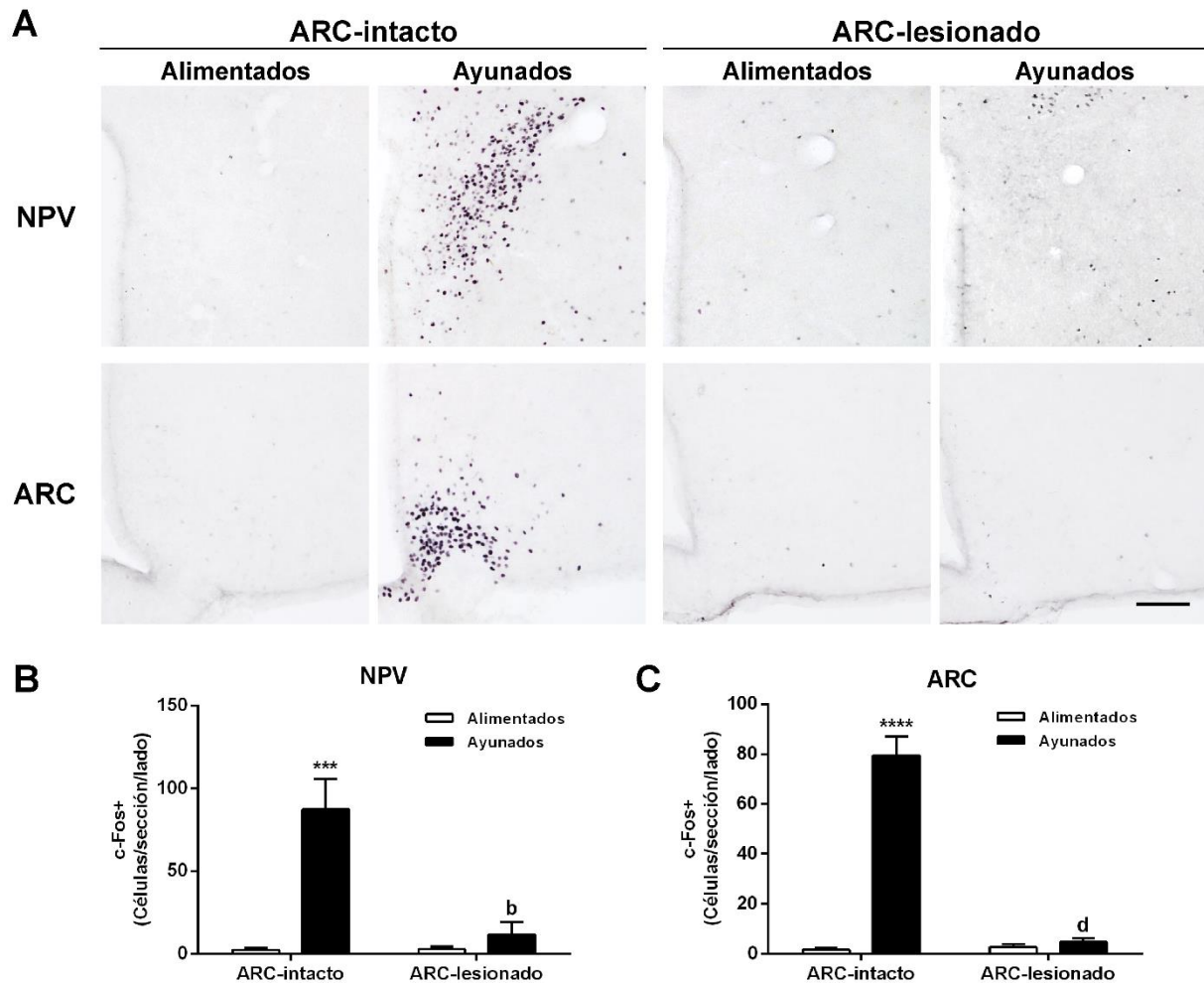


Figura 25: Activación neuronal del NPV y ARC de animales con el ARC-intacto y -lesionado. (A) Microfotografías representativas de la señal c-Fos+ en secciones coronales del NPV y ARC de ratones con el ARC-intacto y el ARC-lesionado sometidos o no a un ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra c-Fos (señal negro/violeta). Los paneles superiores muestran el núcleo NPV y los inferiores el núcleo ARC. Barra de escala: 100µm. (B y C) Análisis cuantitativo del número de células c-Fos+ en el NPV y ARC respectivamente (n=4 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante ANOVA de dos vías. Interacción: NPV: $F(1, 9)=15,37$, $p=0,0035$; ARC: $F(1, 10)=124,5$, $p<0,0001$. Análisis *post-hoc* de Tukey. **** $p<0,0001$ y *** $p<0,001$ vs igual tratamiento, distinta condición; d $p<0,0001$ y b $p<0,01$ vs igual condición, distinto tratamiento.

Luego, estudiamos si los animales con el ARC-lesionado presentan cambios en el nivel de señal inmuno-reactiva para CRF en el NPV. En nuestras condiciones experimentales, el número de células CRF+ en el NPV de animales con el ARC-lesionado ayunados fue $1,6 \pm 0,1$ veces menor respecto a las cuantificadas en los animales con el ARC-intacto ayunados, los cuales mostraron a su vez un aumento del $62,6 \pm 5,0$ % respecto a las cuantificadas en un animal con el ARC-intacto alimentado. No se encontraron diferencias significativas entre los animales con el ARC-lesionado de ambas condiciones experimentales estudiadas (**Figura 26A-B**). Adicionalmente, evaluamos la intensidad de señal CRF+ en el NPV de las mismas secciones de cerebro sometidas a IHQ usadas anteriormente. Los resultados indicaron que la intensidad de la señal CRF+ en el NPV de los animales con el ARC-lesionado ayunados nuevamente no mostró diferencias con ambos grupos alimentados, mientras que los animales con el ARC-intacto ayunados presentaron un aumento de $3,6 \pm 0,4$ veces en la intensidad CRF+ respecto de su grupo control

alimentado. (Figura 26C).

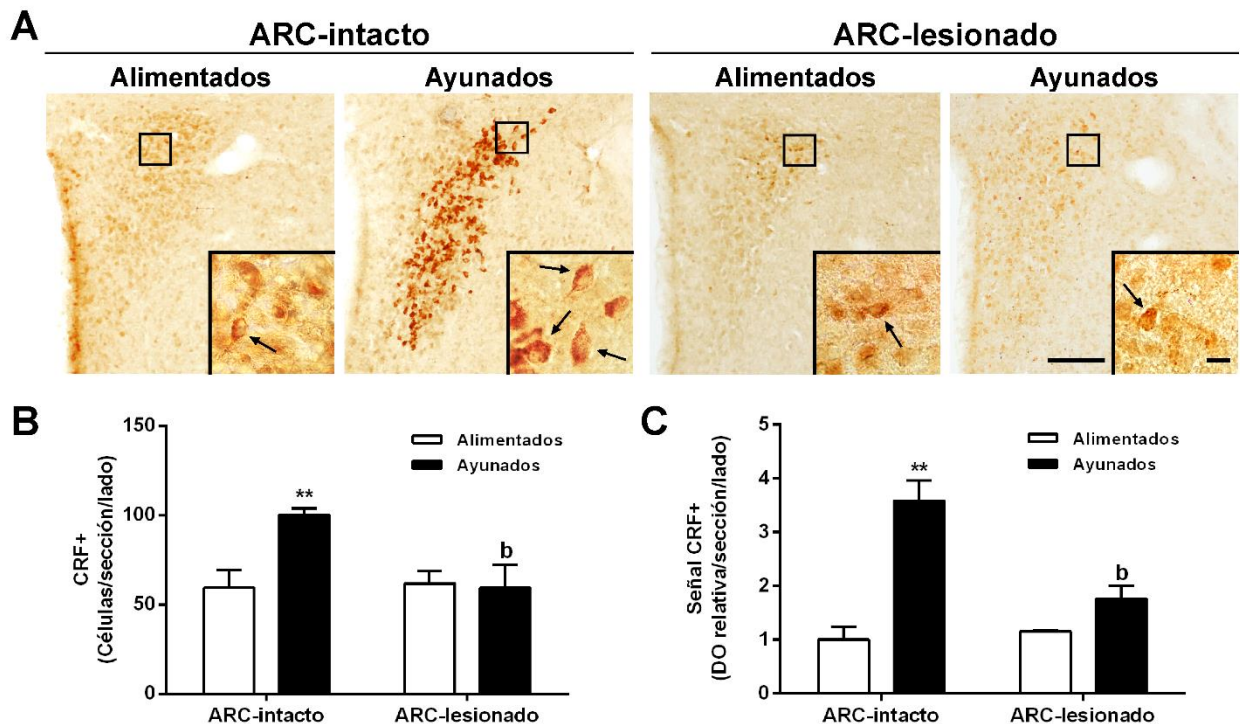


Figura 26: Neuronas CRF del NPV de animales con el ARC-intacto y -lesionado. (A) Microfotografías representativas de la señal CRF+ en secciones coronales del NPV de ratones con el ARC-intacto y el ARC-lesionado sometidos o no a un ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra CRF (señal amarronada). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células CRF+. (B) Análisis cuantitativo del número de células CRF+ en el NPV de cada grupo experimental (n=4 por grupo). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,20)=5,409$, $p=0,0307$. (C) Análisis cuantitativo de la intensidad de señal CRF+ en el NPV de cada grupo experimental (n=4 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,17)=5,781$, $p=0,0279$. Análisis *post-hoc* de Tukey. ** $p<0,01$ vs igual tratamiento, distinta condición; ^b $p<0,01$ vs igual condición, distinto tratamiento.

d) Estudio de la implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF y en los cambios de las innervaciones de las neuronas NPY/AgRP al NPV

Hasta aquí, los resultados muestran que la integridad del núcleo ARC es necesaria para la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en respuesta al ayuno. Dado que las neuronas NPY/AgRP del ARC expresan niveles elevados de GHSR y son un blanco clave en la señalización ejercida por ghrelina, estudiamos particularmente la implicancia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF y las adaptaciones de las innervaciones del ARC al NPV inducidas por un ayuno de 48 hs. Para realizar este estudio, nuevamente utilizamos dos herramientas complementarias: una genética, utilizando animales GHSR(-/-), y una farmacológica, utilizando animales WT tratados con un bloqueante de GHSR.

Para estudiar las adaptaciones de las innervaciones del ARC al NPV durante el ayuno en animales GHSR(-/-), analizamos si las aferencias de las neuronas NPY/AgRP al NPV fueron afectadas durante el ayuno. En primer lugar, realizamos una IHQ contra NPY en secciones de cerebro de ratones WT y GHSR(-/-).

/-) expuestos o no a un ayuno y estimamos la inmuno-reactividad en el NPV. Los animales GHSR(-/-) alimentados presentaron niveles de intensidad de señal NPY+ similares a los animales WT ayunados, y no encontramos diferencias durante el ayuno en animales pertenecientes a este genotipo (**Figura 27A-B**).

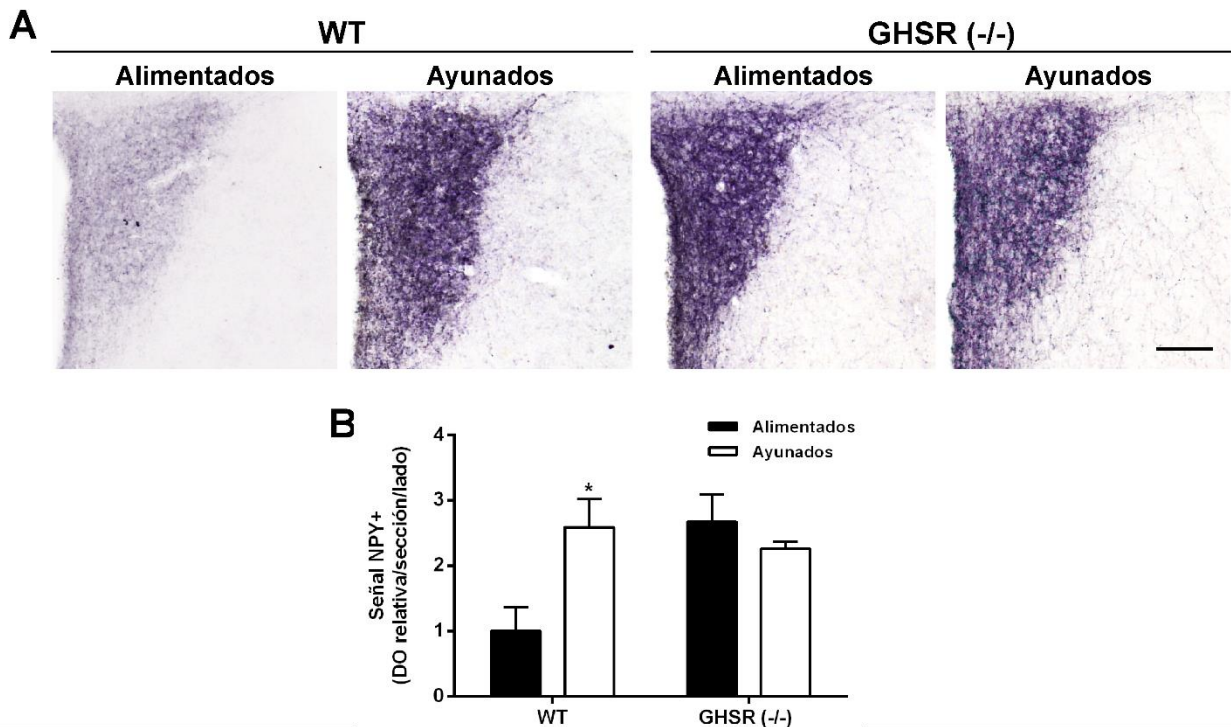


Figura 27: Intensidad de señal NPY+ en el NPV de animales WT y GHSR(-/-) durante el ayuno. (A) Microfotografías representativas de la señal NPY+ en secciones coronales del NPV de ratones WT y GHSR(-/-) sometidos o no a un ayuno, respectivamente, sujetas a una IHQ contra NPY (señal violeta/negro) (n=4-6 por grupo). Barras de escala: 100 μ m. (B) Análisis cuantitativo de la intensidad de señal NPY+ en el NPV. Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,17)=8,011$, $p=0,0115$. Análisis *post-hoc* de Tukey. * $p<0,05$ vs igual genotipo, distinta condición

Posteriormente, analizamos la intensidad de señal fluorescente y la densidad de fibras AgRP+ en el NPV en una segunda serie de las secciones de cerebro de los mismos ratones utilizados anteriormente. Al realizar los análisis cuantitativos, los animales GHSR(-/-) alimentados presentaron valores de intensidad, densidad y densidad integrada de la señal AgRP+ elevados, no encontrándose diferencias con los hallados en los animales WT ayunados (**Figura 28A-D**).

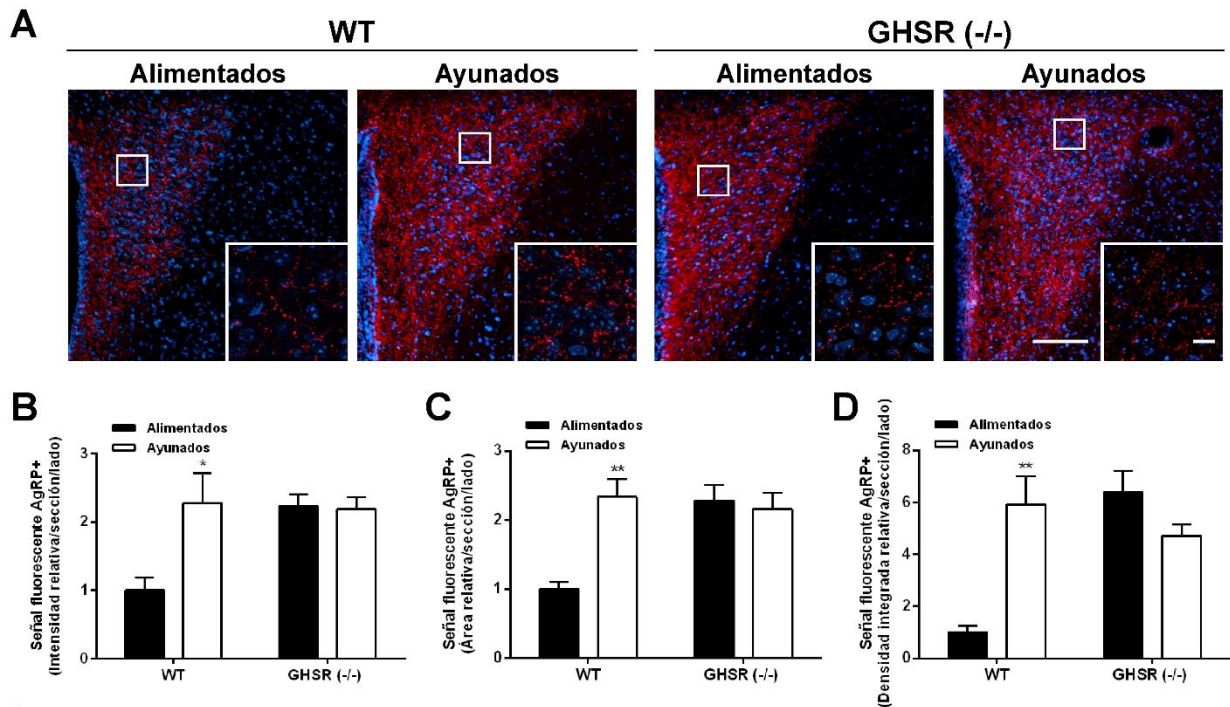


Figura 28: Intensidad, densidad y densidad integrada de señal AgRP+ en el NPV de animales WT y GHSR(-/-) durante el ayuno. (A) Microfotografías representativas de la señal roja fluorescente de secciones coronales de NPV de ratones WT y GHSR(-/-) sometidos o no a un ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra AgRP (n=4-5 por grupo). La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. (B) Análisis cuantitativo de la intensidad de la señal AgRP+ en el NPV. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,13)=4,658$, $p=0,0502$. (C) Análisis cuantitativo del área de señal AgRP+ en el NPV. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,13)=10,52$, $p=0,0064$. (D) Análisis cuantitativo de la densidad integrada de señal AgRP+ en el NPV. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,13)=17,12$, $p=0,0012$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Tukey. ** $p<0,01$ y * $p<0,05$ vs igual genotipo, distinta condición.

De manera complementaria, utilizamos ratones GHSR(-/-)/NPY-GFP, en los que analizamos tanto la intensidad como la densidad de fibras GFP+ en el NPV. De manera similar a los resultados obtenidos para la señal NPY+ en el NPV, encontramos que los animales GHSR(-/-)/NPY-GFP alimentados presentaron niveles de intensidad y de área de fibras GFP+ elevadas y similares a las encontradas en animales NPY-GFP ayunados; no encontrándose diferencias entre los animales GHSR(-/-)/NPY-GFP alimentados y ayunados (**Figura 29A-C**).

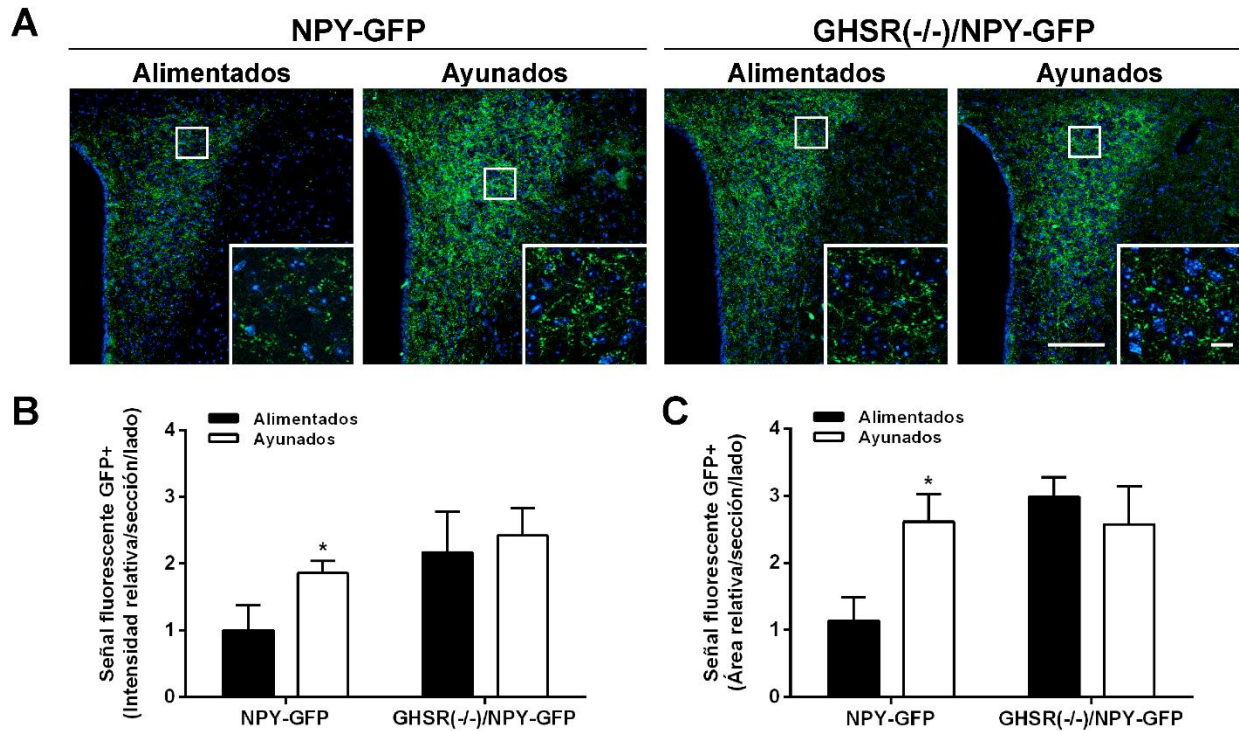


Figura 29: Intensidad y densidad de señal GFP+ en el NPV de animales WT y GHSR(-/-) durante el ayuno.

(A) Microfotografías representativas de la señal verde fluorescente GFP de secciones coronales de NPV ratones NPY-GFP y GHSR(-/-)/NPY-GFP sometidos o no a un ayuno, respectivamente. La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. (B) Análisis cuantitativo de la intensidad de señal GFP+ en el NPV, respectivamente (n=4 por grupo). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,11)=0,5626$, n.s. Genotipo: $F(1,11)=4,691$, n.s. Condición experimental: $F(1,11)=1,942$, n.s. (C) Análisis cuantitativo del área de señal GFP+ en el NPV, respectivamente (n=4 por grupo). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,13)=5,254$, $p=0,0392$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Tukey. * $p<0,05$ igual genotipo, distinta condición.

Luego, determinamos si las neuronas CRF hipofisiotrópicas responden a una situación de ayuno de 48 hs en ratones GHSR(-/-). Para esto, expusimos a ratones GHSR(-/-) y sus hermanos WT a un ayuno, los perfundimos, extrajimos sus cerebros y realizamos una IHQ contra CRF en una de las series de las secciones obtenidas. El número de células CRF+ en el NPV de los animales GHSR(-/-) ayunados fue de $95,4 \pm 3,1$ células/sección/lado aumentando $2,3 \pm 0,1$ veces respecto del grupo GHSR(-/-) alimentado y no difiriendo del incremento observado con el ayuno en animales WT ($2,2 \pm 0,1$ veces respecto del grupo control alimentado) (Figura 30A-B). A pesar de no encontrar diferencias en el número de células CRF+ en el NPV de ambos genotipos de animales ayunados, observamos una menor intensidad en la inmunotinción de los ratones GHSR(-/-). Así, el análisis cuantitativo reveló que éstos animales presentaron una disminución de la intensidad de la señal CRF+ del $50,6 \pm 6,4$ % respecto a la obtenida con los animales WT ayunados, los cuales mostraron un aumento de $3,59 \pm 0,08$ veces respecto a la de su grupo control alimentado (Figura 30C).

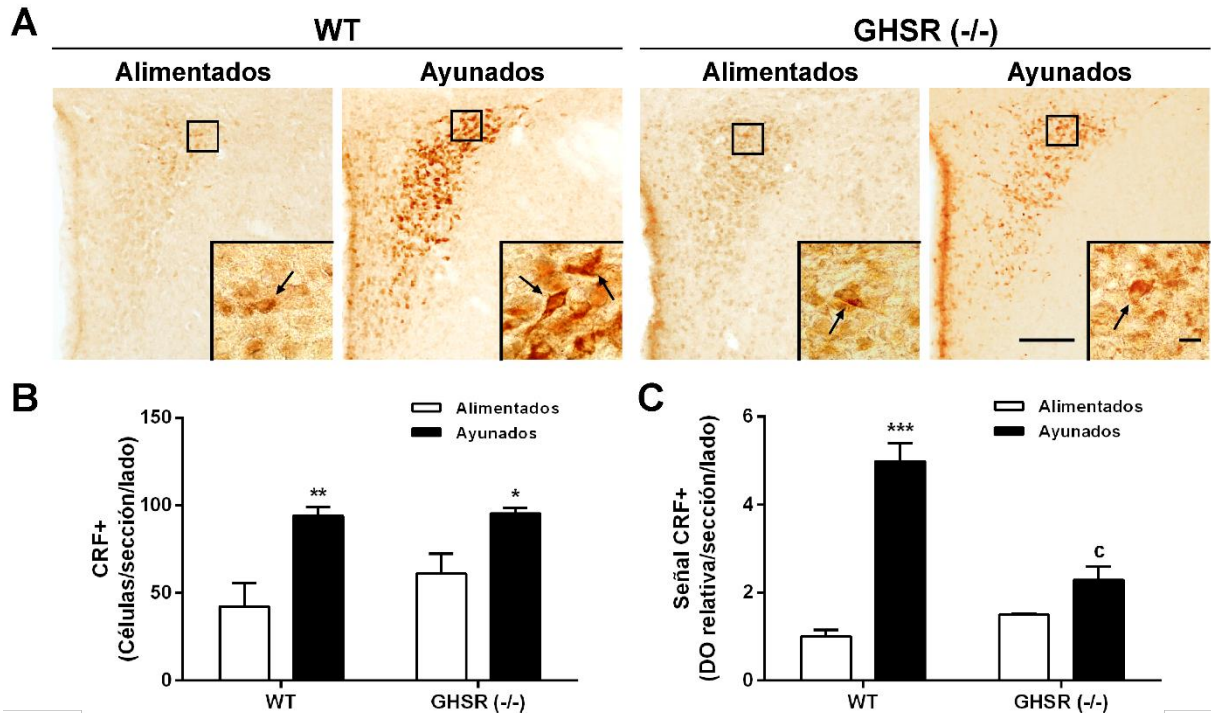


Figura 30: Neuronas CRF+ del NPV de animales WT y GHSR(-/-). **A)** Microfotografías representativas de la señal CRF+ en secciones coronales del NPV de ratones WT y GHSR(-/-) sometidos o no a un ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra CRF (señal amarronada). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células CRF+. **(B)** Análisis cuantitativo del número de células CRF+ en el NPV de cada grupo experimental (n=4-6 por grupo). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,13)=1,449$, n.s. Genotipo: $F(1,13)=1,915$, n.s. Condición experimental: $F(1,13)=35,83$, $p<0,0001$. **(C)** Análisis cuantitativo de la intensidad de señal CRF+ en el NPV de cada grupo experimental (n=4-6 por grupo). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,13)=14,12$, $p=0,0024$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Tukey. *** $p<0,0001$, ** $p<0,01$ y * $p<0,05$ vs igual genotipo, distinta condición; c $p<0,001$ vs igual condición, distinto genotipo.

Posteriormente, realizamos IHQ dobles contra c-Fos y CRF en otra serie de las secciones de los mismos cerebros. El análisis cuantitativo indicó que los animales GHSR(-/-) no presentaron una activación significativa de las neuronas CRF+ del NPV (**Figura 31A-B**). El número de células c-Fos+ totales en el NPV fue de $28,8 \pm 7,9$ células/sección/lado para los animales GHSR(-/-) ayunados y $167,7 \pm 13,8$ células/sección/lado para los animales WT ayunados (**Figura 31C**). Además, los animales GHSR(-/-) ayunados presentaron menores niveles de corticosterona como de glucosa en plasma en comparación con animales WT ayunados ($11,34 \pm 3,28$ ng/ml vs $20,41 \pm 3,09$ ng/ml para corticosterona y $7,1 \pm 0,6$ ng/ml vs $26,6 \pm 2,2$ para glucosa, respectivamente) (**Figura 31D-E**).

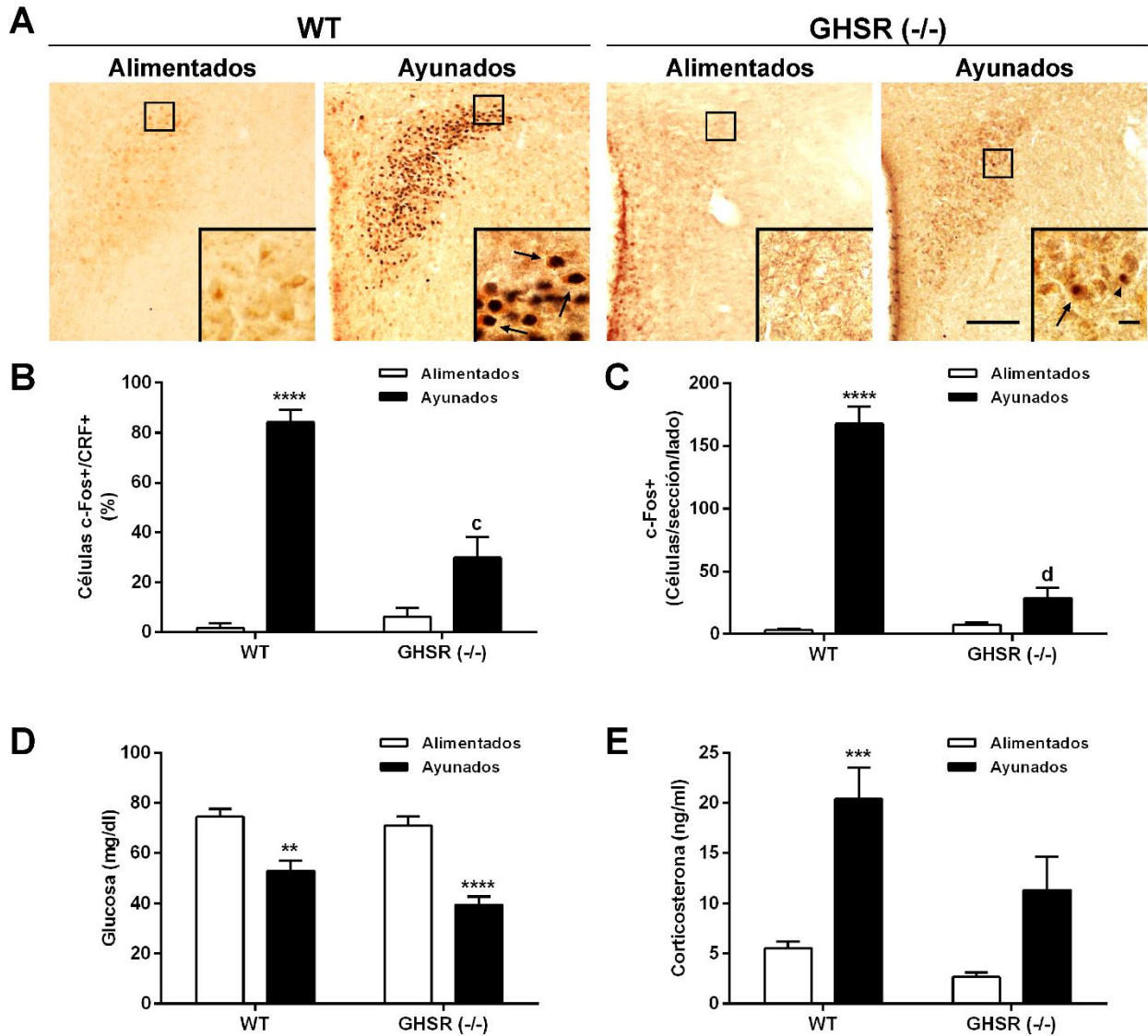


Figura 31: Activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en animales WT y GHSR(-/-) durante el ayuno. (A) Microfotografías representativas de la señal CRF+/c-Fos+ en secciones coronales del NPV de ratones WT y GHSR(-/-) sometidos o no a un ayuno, respectivamente, sujetas a una IHQ doble contra CRF (señal amarronada) y c-Fos (señal negro/violeta). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células c-Fos+/CRF+, mientras que las puntas de flecha marcan las células c-Fos+/CRF-. (B) Análisis cuantitativo del porcentaje de células CRF+/c-Fos+ en el NPV de cada grupo experimental (n=6-11 por grupo). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1, 20)=10,04$, $p=0,0048$. (C) Análisis cuantitativo del número de células c-Fos+ en el NPV de cada grupo experimental (n=6-11 por grupo). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,35)=59,63$, $p<0,0001$. (D) Niveles plasmáticos de corticosterona en cada grupo experimental (n=8-13). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,35)=1,377$, n.s. Genotipo: $F(1,35)=5,104$, $p=0,0302$. Condición experimental: $F(1,35)=19,87$, $p<0,0001$. (E) Niveles plasmáticos de glucosa en cada grupo experimental (n=8-13). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,33)=1,531$, n.s. Genotipo: $F(1,33)=4,350$, $p=0,0448$. Condición experimental: $F(1,33)=41,91$, $p<0,0001$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Tukey. **** $p<0,00001$, *** $p<0,001$ y ** $p<0,01$ vs igual genotipo, distinta condición; d $p<0,0001$ y c $p<0,001$ vs igual condición, distinto genotipo.

Para los experimentos de bloqueo farmacológico utilizamos ratones WT tratados ICV cada 8 hs durante el periodo de ayuno con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂, como se describe en el capítulo anterior. Los ratones recibieron en total 6 inyecciones durante el periodo de ayuno y luego los anestesiábamos, perfundimos, extrajimos sus cerebros y los cortamos. En primer lugar, realizamos una IHQ

contra AgRP y estimamos la intensidad, la densidad y la densidad integrada de las fibras AgRP+ provenientes del ARC. Al realizar los análisis cuantitativos, tanto la intensidad, el área como la densidad integrada de la señal AgRP+ disminuyeron en un $38,4 \pm 9,9 \%$, $49,7 \pm 13,1 \%$ y $54,3 \pm 19,0 \%$, respectivamente, en los ratones ayunados tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ respecto a los tratados con vehículo (**Figura 32A-D**).

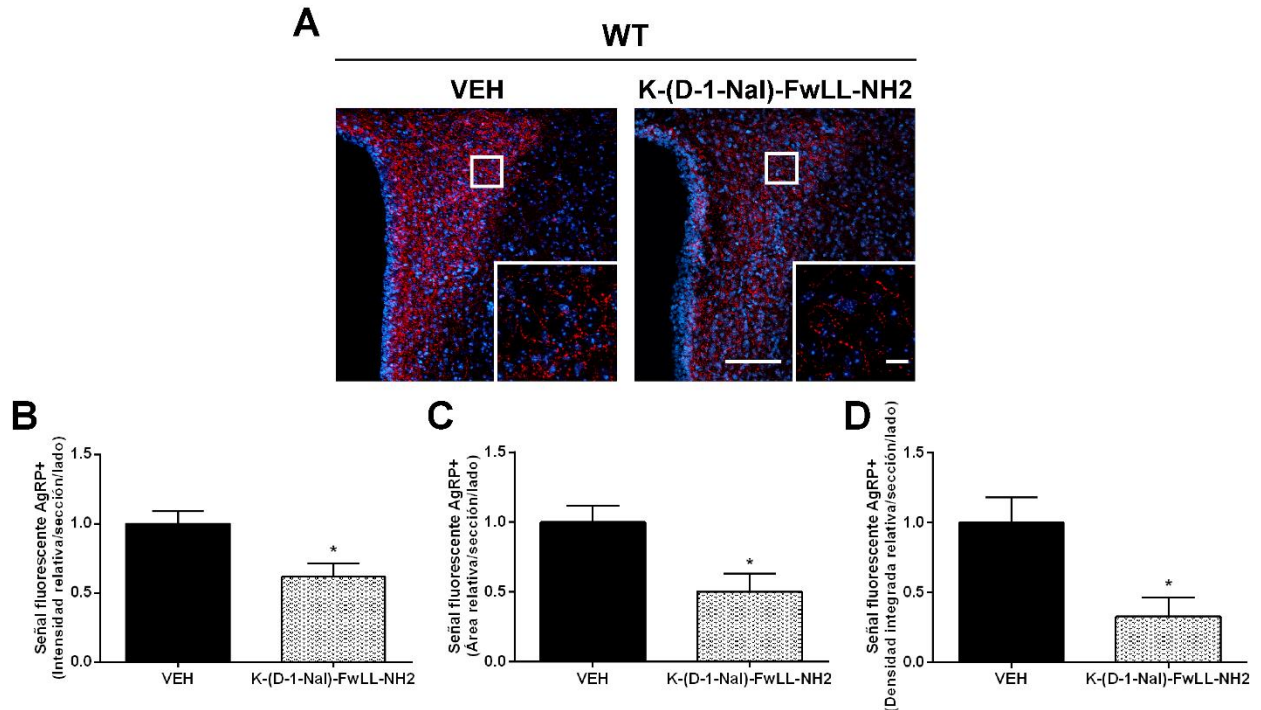


Figura 32: Intensidad, densidad y densidad integrada de señal AgRP+ en el NPV en animales WT ayunados tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH2 durante el ayuno. **(A)** Microfotografías representativas de la señal roja fluorescente de secciones coronales de NPV de ratones WT tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH2 durante el ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra AgRP. La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Barras de escala: 100 y 10 µm para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente. **(B, C y D)** Análisis cuantitativo de la intensidad, la densidad y la densidad integrada de la señal AgRP+ en el NPV, respectivamente (n=6 por grupo). Los datos representan la media ± SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. * p<0,05 vs animales ayunados tratados con vehículo.

Adicionalmente, evaluamos c-Fos en el NPV, donde encontramos que el número de células c-Fos+ totales en ratones WT ayunados tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ fue $39,1 \pm 8,8 \%$ menor respecto a las cuantificadas en los animales ayunados inyectados vehículo (**Figura 33A-B**).

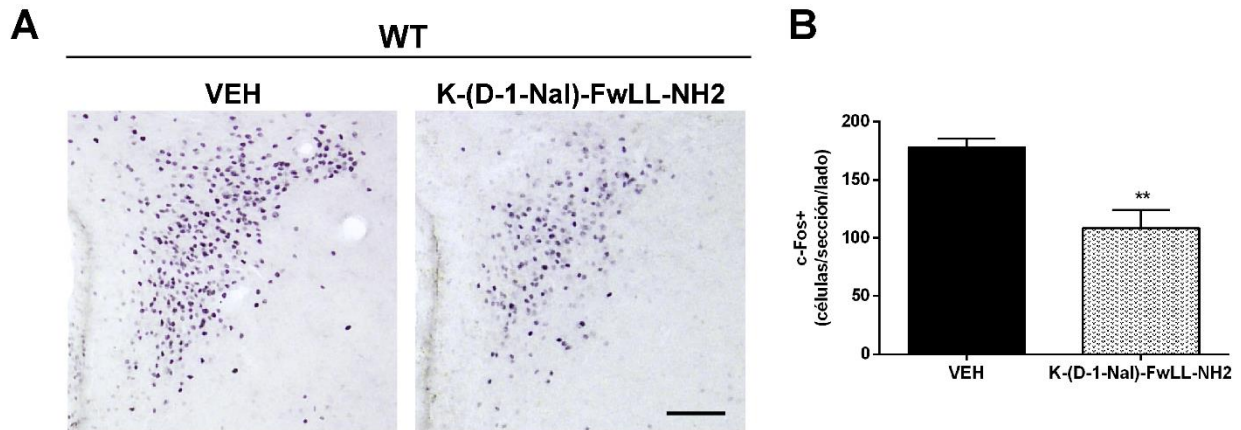


Figura 33: Activación neuronal del núcleo NPV en animales WT ayunados tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH2 durante el ayuno. **(A)** Microfotografías representativas de la señal c-Fos+ en secciones coronales del NPV de ratones WT tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH2 durante el ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra c-Fos (señal negro/violeta). **(B)** Análisis cuantitativo del número de células c-Fos+ en el NPV de cada grupo experimental (n=9-13 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. ** $p < 0,01$ vs animales ayunados tratados con vehículo.

Finalmente, el número de células CRF+ en ratones WT ayunados tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH2 fue de 122 ± 12 células/sección/lado no difiriendo de las cuantificadas en los animales ayunados inyectados con vehículo. Sin embargo, cuando analizamos la intensidad de la señal CRF+ dentro del NPV, encontramos nuevamente una disminución del $24,5 \pm 6,3\%$ respecto a la hallada en los animales ayunados inyectados vehículo (**Figura 34A-C**). En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas y las adaptaciones de las inervaciones del ARC al NPV inducidos por ayuno dependen de la señalización del sistema ghrelina/GHSR.

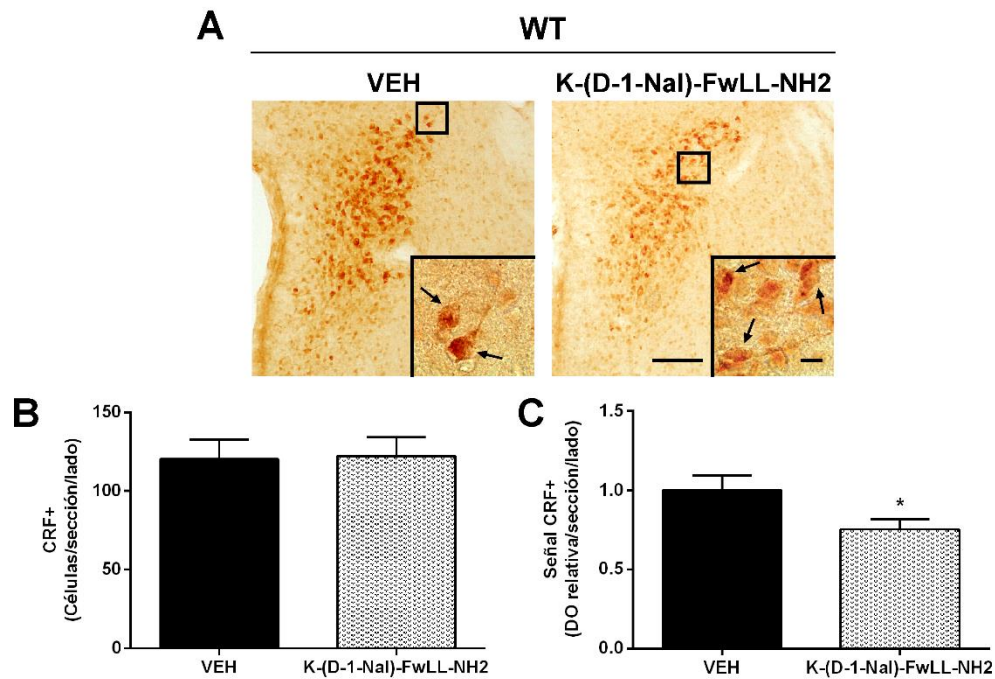


Figura 34: Neuronas CRF del NPV de animales WT ayunados tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH2 durante el ayuno. A) Microfotografías representativas de la señal CRF+ en secciones coronales del NPV de ratones WT tratados con vehículo o K-(D-1-Nal)-FwLL-NH2 durante el ayuno, respectivamente, las cuales fueron sujetas a una IHQ contra CRF (señal amarronada). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células CRF+. **(B)** Análisis cuantitativo del número de células CRF+ en el NPV de cada grupo experimental (n=6 por grupo). **(C)** Análisis cuantitativo de la intensidad de señal CRF+ en el NPV de cada grupo experimental (n=6 por grupo). Los datos representan la media \pm SEM y fueron comparados mediante la prueba t de Student con corrección de Welch. * $p < 0,05$ vs animales ayunados tratados con vehículo.

CAPÍTULO 3
ESTUDIO DEL ROL MODULADOR DE LA DAG SOBRE EL SISTEMA
GHRELINA/GHSR A NIVEL HIPOTALÁMICO

Dado que los niveles de DAG en plasma se encuentran elevados durante el ayuno, en este tercer Capítulo de Tesis Doctoral estudiamos los posibles sitios de acción de la DAG en el cerebro y las consecuencias funcionales de su acción en el ARC y su relación con el sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico.

a) Estudio de la accesibilidad y activación de los núcleos hipotalámicos en respuesta a la administración central de la DAG

Para determinar las áreas del cerebro que responden directamente a la DAG, en primer lugar implantamos cánulas en el ventrículo lateral de ratones WT una semana antes del experimento. Una vez recuperados, los administramos centralmente con LCRa (vehículo) o un análogo de 19-aminoácidos de la DAG conjugada con una molécula de isotiocianato de fluoresceína (F-DAG). De manera similar a los estudios de unión llevados a cabo previamente, utilizamos la F-DAG para evidenciar indirectamente la presencia de su posible receptor, a través de la detección de las neuronas a las que se une el trazador. Luego de 30 minutos post-inyección, anestesiábamos a los ratones, los perfundimos, extrajimos sus cerebros y los cortamos para su posterior examen al microscopio de fluorescencia. En estas condiciones, observamos cuerpos celulares con señal fluorescente verde exclusivamente en los animales inyectados con F-DAG, no observando señal en los ratones tratados con vehículo.

El área del cerebro con mayor número e intensidad de células verdes fluorescentes fue el ARC. Como especificamos en el Capítulo 1, con el fin de aumentar la sensibilidad y estabilizar la señal fluorescente para realizar una posterior caracterización neuroanatómica, realizamos en este caso una IHQ fluorescente contra fluoresceína. La IHQ mostró especificidad dado que no observamos ninguna señal en las muestras de cerebro de ratones tratados con vehículo (**Figura 35A**). Adicionalmente, realizamos un control de especificidad del tratamiento administrando ICV F-DAG y DAG y encontramos que la señal fluoresceína+ se redujo a un $35,7 \pm 7,1$ % de la señal detectada en ratones inyectados únicamente con F-DAG cuando agregamos un exceso de DAG no marcada (**Figura 35A**).

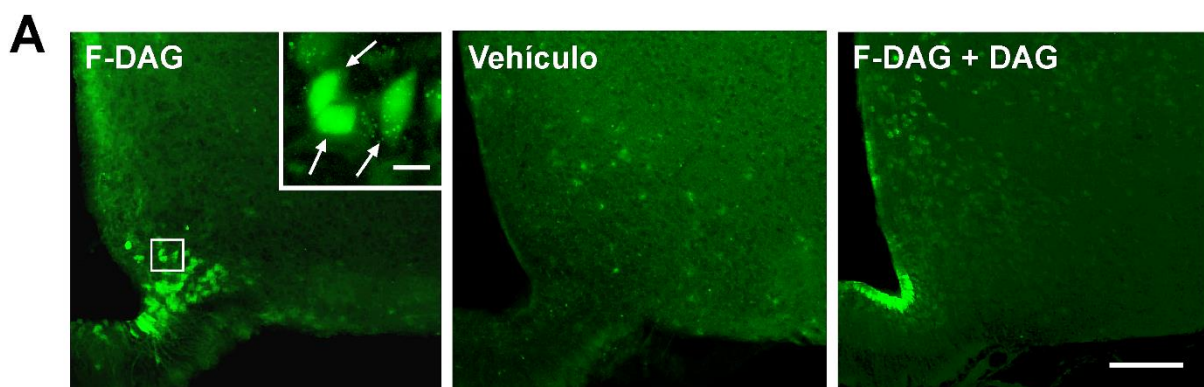


Figura 35: Unión de F-DAG en el ARC. (A) Microfotografías representativas de la señal fluoresceína+ en secciones coronales del ARC de ratones inyectados ICV con F-DAG (izquierda), vehículo (centro) y F-DAG más un exceso de DAG (derecha), respectivamente, que fueron sujetas a una IHQ fluorescente contra fluoresceína (n=4-5 por grupo). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas señalan las células fluoresceína+. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente.

Desde el punto de vista neuroanatómico, encontramos células marcadas con F-DAG principalmente en el ARC, distribuidas en toda la extensión rostro-caudal del núcleo entre los bregmas -1,22 y -2,46 mm (**Figura 36A-C**). Estimamos ~500 células fluoresceína+ a lo largo del ARC, las cuales se encontraron concentradas en el ARCvm en cercanía a la EM. El diámetro citoplasmático promedio de las células fluoresceína+ fue de ~12,5 μ m. También encontramos células fluoresceína+ localizadas en la capa endimaria que recubre las paredes del tercer ventrículo, principalmente en la que reviste el suelo de la cavidad del infundíbulo. En contraste, en el resto de la capa endimaria, incluyendo la parte superior del tercer ventrículo, observamos un perfil irregular con señal fluoresceína+ presente exclusivamente en el cuerpo celular de algunas células, pero no de todas. También encontramos en menor medida e intensidad, células fluoresceína+ dispersas por el AP y otras áreas hipotalámicas y extra-hipotalámicas particularmente cerca de los ventrículos (por ejemplo, en el DMH). Sin embargo, no se encontraron células positivas en el hipocampo, cerebelo ni corteza cerebral.

Para estudiar si la F-DAG actúa sobre las neuronas del ARC, estimamos la activación transcripcional debida al tratamiento ICV con F-DAG a través de una IHQ contra c-Fos. El análisis cuantitativo mostró un aumento en el número de células c-Fos+ en el ARC de los ratones inyectados con F-DAG respecto a los valores detectados en ratones inyectados con vehículo (34 ± 2 y 14 ± 2 células c-Fos+/sección/lado, respectivamente, $p < 0,01$). Dado que la F-DAG posee unido un isotiocinato de fluoresceína que podría impactar en la inducción de c-Fos y, que además, es una variante corta de la DAG intacta, analizamos el efecto de la DAG nativa inyectada ICV sobre los niveles de c-Fos. Al igual que lo observado anteriormente, el análisis cuantitativo indicó un aumento en el número de células c-Fos+ en el ARC de ratones inyectados con DAG respecto a los valores detectados en ratones inyectados con vehículo. En particular, cuantificamos 28 ± 4 y 9 ± 2 células c-Fos+/sección/lado en el ARC de ratones inyectados con DAG y vehículo, respectivamente ($p < 0,01$) (**Figura 36D**). Además, las células c-Fos+ se localizaron principalmente en el ARCvm, con un patrón de distribución similar al observado para las células marcadas con F-DAG. Además del ARC, la DAG indujo un aumento significativo del número de células c-Fos+ en el NPV (Datos no mostrados), aunque no detectamos unión de F-DAG en este núcleo.

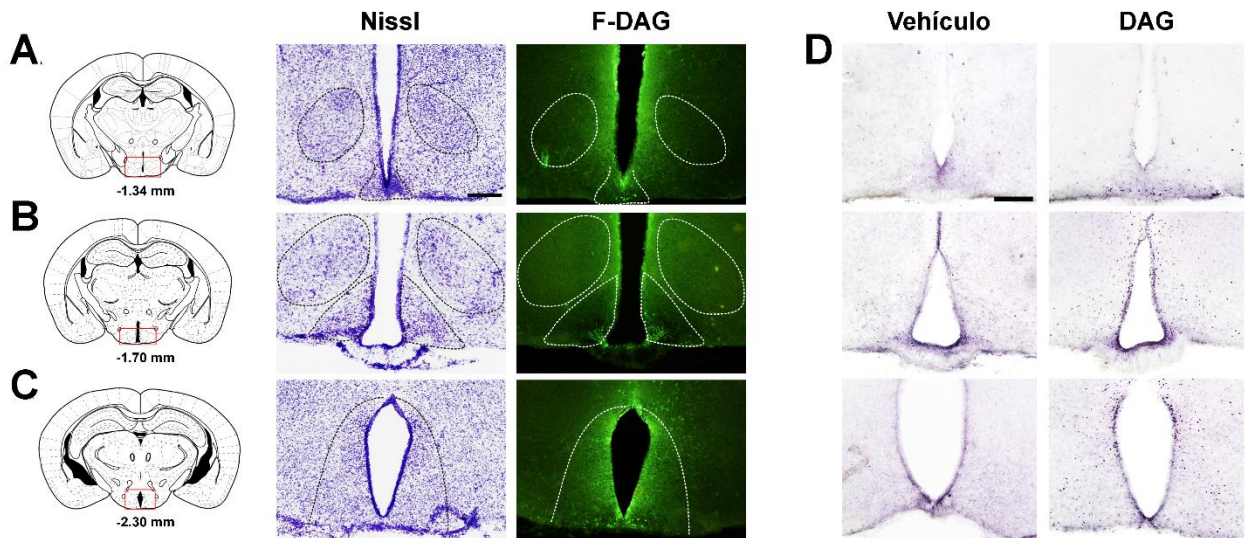


Figura 36: Patrón de distribución de las células marcadas con F-DAG y de la activación neuronal inducida por DAG en el ARC. El panel muestra microfotografías representativas del nivel anterior (A), medial (B) y posterior (C) del ARC que contienen células+ para F-DAG. Para cada nivel, mostramos un diagrama de la sección coronal correspondiente marcada con un rectángulo que marca la región aproximada de donde se obtuvieron las imágenes (izquierda), las microfotografías de las tinciones de Nissl (centro) y las inmunohistoquímicas contra fluoresceína en las mismas secciones (derecha). (D) Microfotografías representativas de las IHQ contra c-Fos en los mismos niveles anterior, medial y posterior de ARC correspondientes a ratones tratados ICV con vehículo o DAG, respectivamente (n=7). Barras de escala: 100 μ m

Con el fin de caracterizar el fenotipo de las células del ARC que unen F-DAG, utilizamos cortes de cerebro de ratones pre-tratados con colchicina y posteriormente tratados ICV con F-DAG, para realizar IHQs fluorescentes dobles contra marcadores de las principales poblaciones neuronales del ARC. Realizamos un pre-tratamiento con colchicina debido a que, como se vio en el Capítulo 1, la IHQ no permite la visualización de los cuerpos neuronales NPY+ en los animales alimentados. El pre-tratamiento con colchicina bloqueó el transporte axonal de NPY pero no afectó el patrón de marca de F-DAG. En estas condiciones, detectamos células doblemente marcadas cuando realizamos una IHQ contra fluoresceína y NPY (**Figura 37A**). El análisis cuantitativo del grado de co-localización nos indicó que el $33 \pm 4\%$ de las células NPY+ también fueron fluoresceína+, mientras que el $78 \pm 4\%$ de las células fluoresceína+ fueron NPY-. Por el contrario, no detectamos células doblemente marcadas cuando realizamos una IHQ contra fluoresceína y POMC (**Figura 37B**). Adicionalmente, realizamos una IHQ contra vimentina, un marcador específico de tanicitos hipotalámicos y algunas células ependimarias (Sanchez et al., 2009, Mullier et al., 2010), encontrando un enriquecimiento de la señal fluoresceína+ en tanicitos hipotalámicos y algunas células ependimales que también resultaron ser vimentina+. Dentro de los tanicitos, encontramos señal fluoresceína+ tanto en el cuerpo celular como en las proyecciones que se extienden profundamente en la EM (**Figura 37C**).

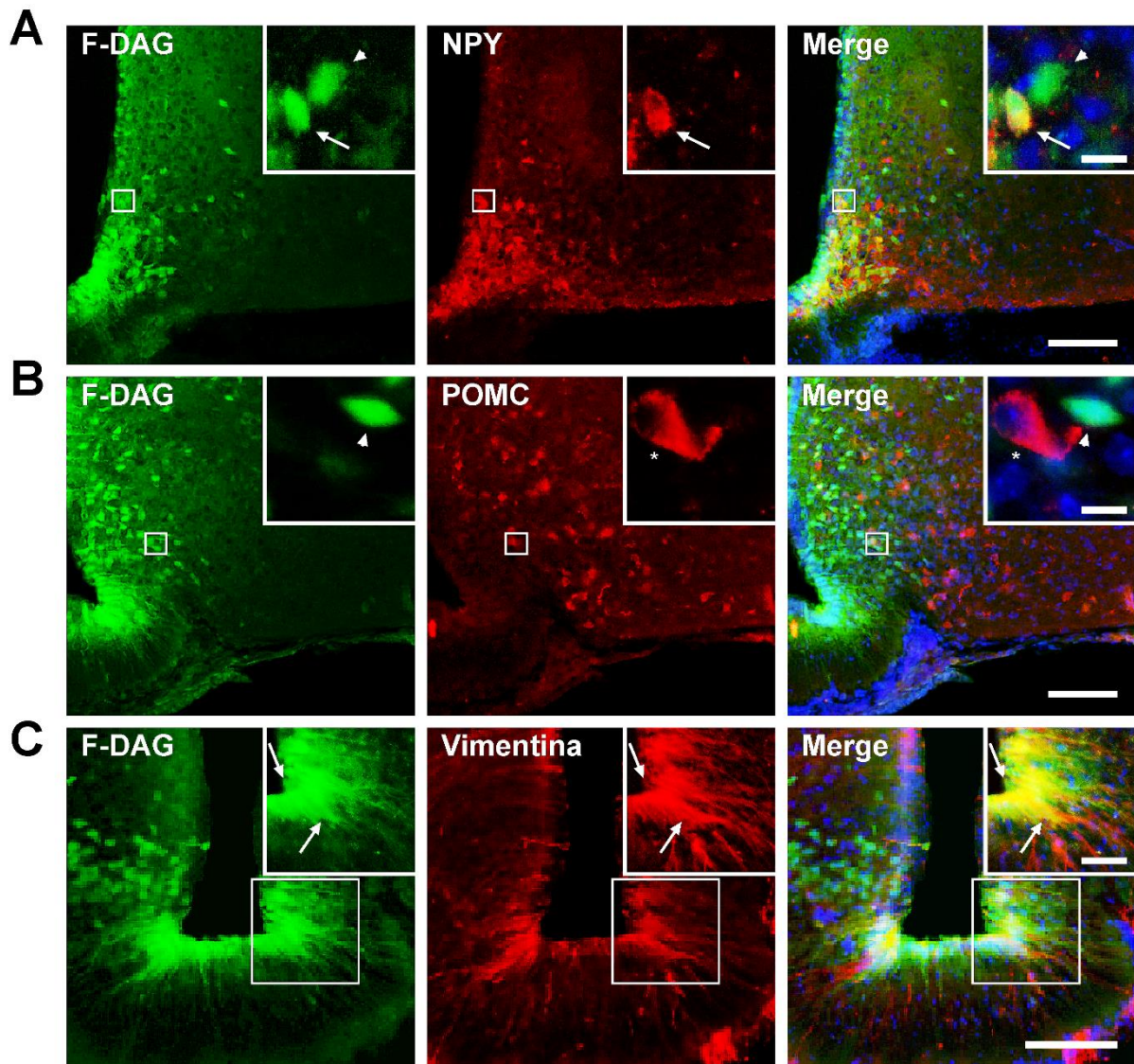


Figura 37: Estudio del fenotipo de las células que unen F-DAG en el ARC. Los paneles muestran un conjunto de imágenes representativas de secciones coronales de ARC (**A y B**) y de la EM (**C**) de un ratón inyectado ICV con F-DAG, sujetas a IHQs fluorescentes dobles contra fluoresceína en verde y contra NPY (**A**), contra POMC (**B**) o contra vimentina (**C**) que posteriormente se visualizaron usando un anticuerpo secundario rojo. La tinción azul corresponde al Hoescht, utilizado para marcar los núcleos celulares. El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Para cada panel, se muestran imágenes de baja y alta magnificación para los canales verde (izquierdo), rojo (centro) y el *merge* (derecha). Las flechas marcan las células positivas ambas marcas; las punta de flecha marcan las células positivas para fluoresceína; y los asteriscos marcan las células positivas para una sola marca. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente.

b) **Estudio de la modulación de la señalización del sistema ghrelina/GHSR por la DAG**

Dado que las neuronas NPY del ARC expresan GHSR, estudiamos si la unión y el efecto de DAG dependen de este receptor. En primer lugar, utilizamos ratones GHSR(-/-) a los cuales inyectamos centralmente con vehículo o F-DAG, y utilizamos las secciones de cerebro obtenidas para realizar una IHQ contra fluoresceína como se describió previamente. Al igual que en los animales WT, visualizamos células fluoresceína+ en el ARC de los ratones GHSR(-/-) inyectados con F-DAG, no observando señal fluorescente en los animales inyectados con vehículo (**Figura 38A**). Luego, evaluamos si la activación transcripcional de las células del ARC mediada por DAG también ocurre de manera independiente a este receptor. Para esto, realizamos una IHQ contra c-Fos en los animales GHSR(-/-) tratados ICV con vehículo o DAG. Al igual que en los animales WT, los animales GHSR(-/-) tratados con DAG mostraron un aumento en el número de células c-Fos+ en el ARC en comparación con los números encontrados en los animales tratados con vehículo (31 ± 4 y 3 ± 1 células c-Fos+/sección/lado, respectivamente, $p < 0,01$) (**Figura 38B**). De igual manera, también observamos una activación del NPV de estos animales con el tratamiento (Datos no mostrados).

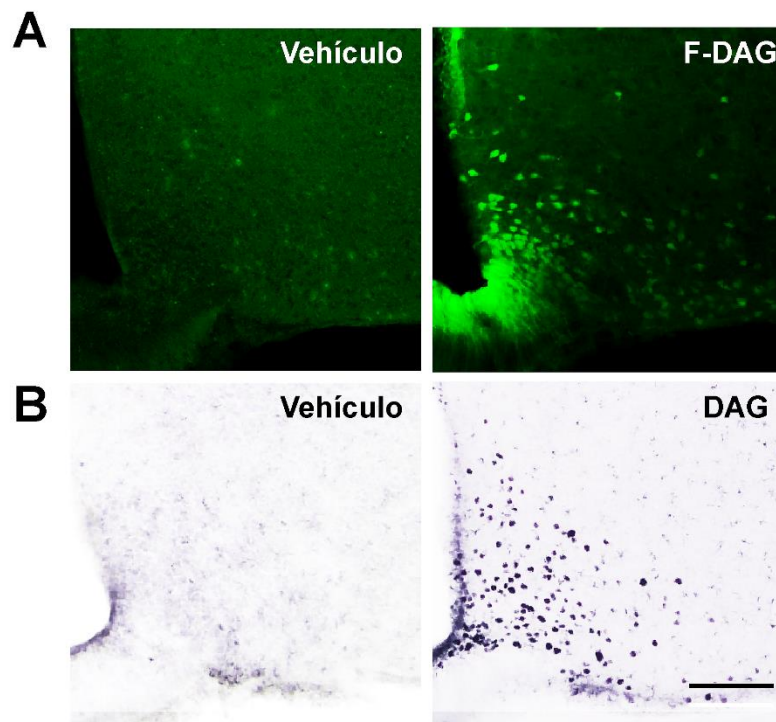


Figura 38: Unión y activación de F-DAG en el ARC de ratones GHSR(-/-). **(A)** Microfotografías representativas de la señal fluoresceína+ en secciones coronales del ARC de ratones GHSR(-/-) inyectados ICV con vehículo (izquierda) o F-DAG (derecha), que fueron sujetas a una IHQ fluorescente contra fluoresceína (n=3-5 por grupo). **(B)** Microfotografías representativas de la señal c-Fos+ en secciones coronales del ARC de ratones GHSR(-/-) inyectados ICV con vehículo (izquierda) o DAG (derecha), que fueron sujetas a una IHQ contra c-Fos (n=5-6 por grupo). Barra de escala: 100 μ m.

c) Estudio de la bioactividad de la DAG a través de la evaluación del efecto orexigénico

La F-DAG marca las neuronas del ARC y la DAG activa dichas neuronas. Dado que el ARC es fundamental en el control del balance energético, evaluamos si la DAG afecta la ingesta de alimento. Estudios previos han mostrado que la DAG inhibe el consumo de alimento, por lo tanto evaluamos este efecto en animales WT bajo condiciones de elevada ingesta, como lo son la fase oscura del ciclo luz/oscuridad y luego de un periodo de ayuno. Para esto, utilizamos un grupo de ratones implantados con cánulas en el ventrículo lateral a los cuales les inyectamos vehículo o DAG previo al inicio del ciclo oscuridad y medimos la ingesta nocturna durante la primera fase de este ciclo (3 hs) y durante toda la noche (12 hs). Después de 2 días de recuperación, expusimos a los mismos animales a un protocolo de ayuno-realimentación. En este caso, retiramos el alimento de las cajas a las 18:00 hs y, a las 10:00 hs del día siguiente, les administramos vehículo o DAG. Luego de las inyecciones, realimentamos a los ratones, dejándoles libre acceso a un pellet de dieta estándar previamente pesada y midiendo el consumo de alimento a los 30 minutos, 2 hs y 12 hs. En nuestras condiciones experimentales, la DAG inyectada ICV no afectó el consumo de alimento espontáneo durante la fase oscura (**Figura 39A**) ni durante la realimentación luego de un periodo de ayuno (**Figura 39B**).

Dado que las neuronas del ARC median la acción orexigénica de la ghrelina, evaluamos la posible interacción entre la DAG y la ghrelina sobre la ingesta de alimento. Para esto, estudiamos el efecto del pre-tratamiento ICV con DAG en ratones inyectados 15 minutos después por vía subcutánea (SC) o ICV con ghrelina (**Figura 39C**). El pre-tratamiento ICV con DAG redujo el aumento en la ingesta de alimentos durante 2 hs inducido por la administración subcutánea de ghrelina, en comparación con los ratones tratados con vehículo. Llamativamente, el pre-tratamiento ICV con DAG no afectó la ingesta de alimentos durante 2 hs inducido por la ghrelina inyectada ICV. Además, el pre-tratamiento ICV con F-DAG también redujo el aumento en la ingesta de alimentos inducido por la administración periférica de ghrelina ($0,14 \pm 0,04$ vs. $0,47 \pm 0,03$ g en animales inyectados previamente con vehículo, respectivamente, $p < 0,01$).

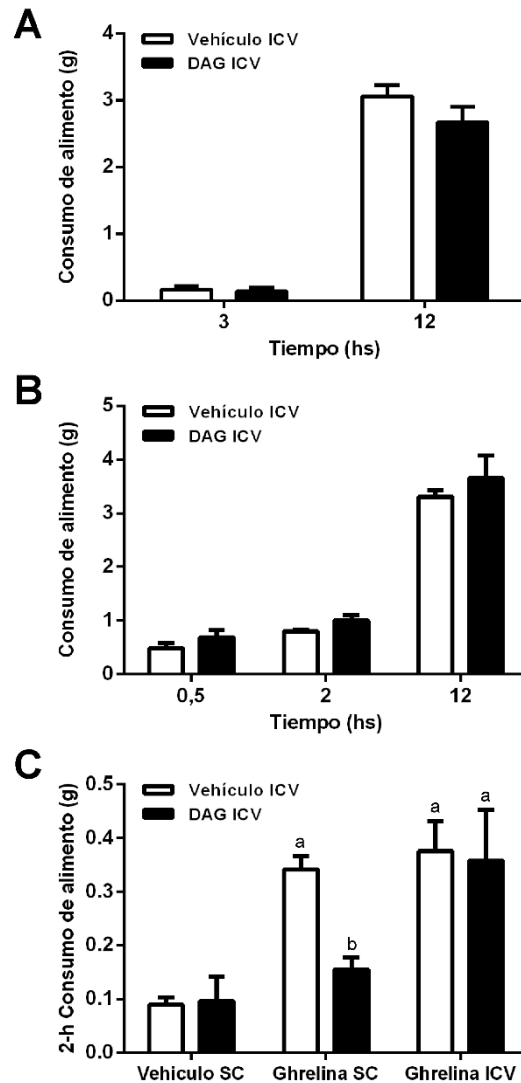


Figura 39: Efecto de la DAG sobre el consumo de alimento. (A) Consumo de alimento durante 3 hs o 12 hs durante la fase oscura del ciclo luz/oscuridad de ratones tratados ICV con vehículo o DAG, respectivamente (n=17). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(1,40)=1,454$, n.s. Tratamiento: $F(1,40)=1,924$, n.s. Tiempo: $F(1,40)=325,4$, $p<0,0001$. (B) Consumo de alimento durante 0,5, 2 y 12 hs de ratones previamente ayunados y luego tratados ICV con vehículo o DAG, respectivamente, previo a la realimentación (n=8-9). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(2,29)=0,09280$, n.s. Tratamiento: $F(1,29)=2,386$, n.s. Tiempo: $F(2,29)=122,6$, $p<0,0001$. (C) Consumo de alimento durante 2 hs de ratones pre-tratados con vehículo o DAG y subsecuentemente con vehículo SC, ghrelin SC o ghrelin ICV (n=6-20). ANOVA de dos vías. Interacción: $F(2,56)=3,952$, $p=0,0248$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Tukey. a $p<0.05$ vs ratones pre-tratados con vehículo y vehículo SC, b $p<0.05$ vs ratones con pre-tratados con vehículo y mismo tratamiento posterior.

Con la finalidad de obtener información adicional sobre el posible mecanismo por el cual la DAG disminuye el efecto orexigénico de la ghrelin administrada por vía subcutánea, analizamos el número de células c-Fos+ en las distintas subregiones del ARC de los grupos experimentales descritos anteriormente (Figura 40A-B). Los resultados mostraron que el número de células c-Fos+ en cada subregión del ARC muestra una distribución topográfica diferencial para los distintos grupos experimentales. En la subregión dorsal del ARC (ARCD) no encontramos diferencias en el número de células c-Fos+ entre los distintos tratamientos y pre-tratamientos realizados. Sin embargo el número de células c-Fos+ presentó un patrón de cambio similar en todos los tratamientos por igual cuando se realiza

un pre-tratamiento con DAG sin alcanzarse la significancia estadística (**Figura 40C**). Encontramos resultados similares en el ARCvl, aunque particularmente en esta subregión los ratones inyectados ICV con ghrelina mostraron un aumento en el número de células c-Fos+ en comparación con los ratones inyectados con vehículo (**Figura 40E**). Por último, en el ARCvm se encontraron las diferencias más robustas en cuanto a la inducción de c-Fos con los distintos pre-tratamientos y tratamientos posteriores. Particularmente se encontró que el pre-tratamiento con DAG indujo un aumento adicional en el número de células c-Fos+ inducidas por el vehículo, por la ghrelina SC o por la ghrelina ICV, siendo de igual magnitud en todos los casos. Por lo tanto, el número de células c-Fos+ en esta subregión del ARC de los ratones pre-tratados ICV con DAG aumenta de manera similar, en comparación con su propio vehículo, independientemente del tratamiento posterior (**Figura 40D**).

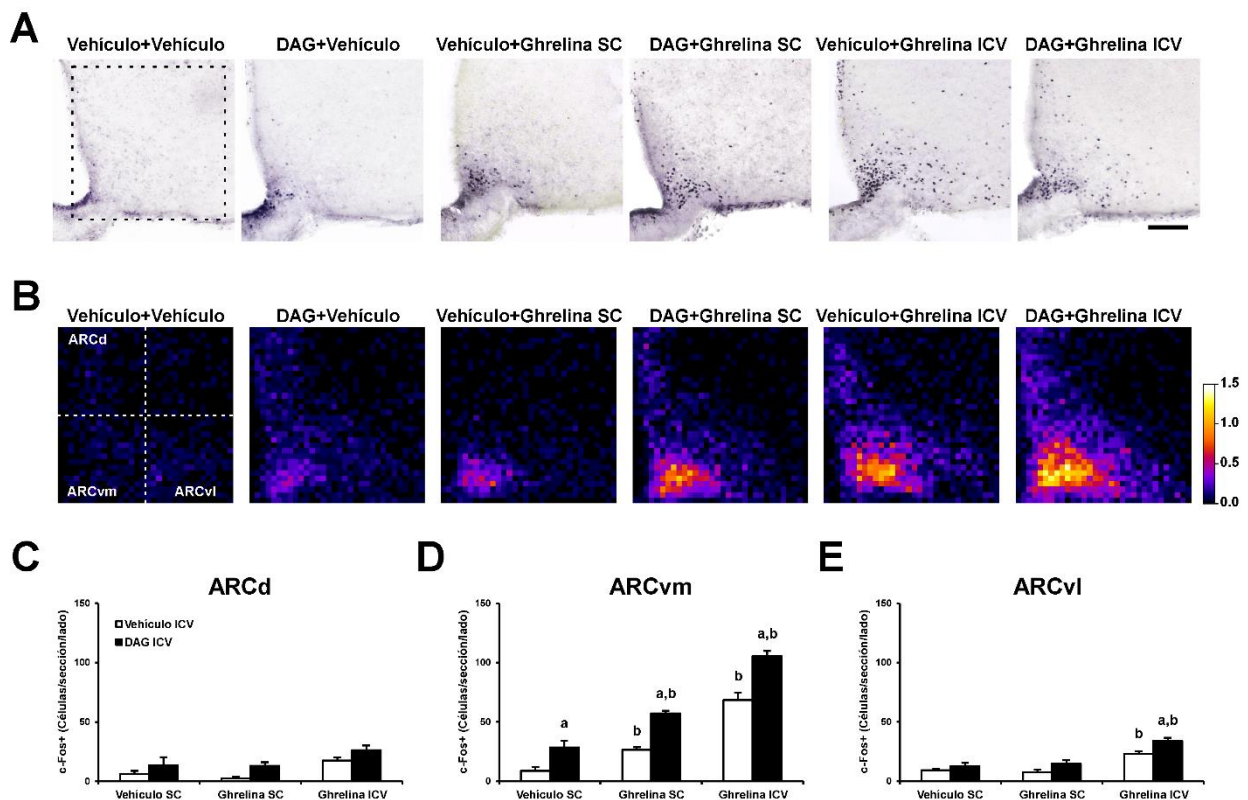


Figura 41: Distribución topográfica diferencial de las células c-Fos+ en el ARC. (A) Microfotografías representativas de secciones coronales de ARC de ratones pertenecientes a cada grupo experimental sujetos a una IHQ contra c-Fos. (B) Densidad de células c-Fos+ promedio en un cuadrado de 400 x 400 µm ubicado en una región que comprende al ARC, para grupo experimental. La ubicación de la región analizada se ejemplifica en (A) con un cuadrado punteado. La densidad la expresamos en células c-Fos+ / contenedor (12.5 µm por lado). Barras de escala: 100 µm. (C) Análisis cuantitativo del número de células c-Fos+ en el ARCd de ratones pertenecientes a cada grupo experimental. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(2,21)=0,1114$, n.s. Pre-tratamiento: $F(1,21)=9,415$, $p=0,0058$. Tratamiento: $F(2,21)=8,92$, $p=0,0016$. (D) Análisis cuantitativo del número de células c-Fos+ en el ARCvm de ratones pertenecientes a cada grupo experimental. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(2,21)=2,322$, n.s. Pre-tratamiento: $F(1,21)=80,88$, $p<0,0001$. Tratamiento: $F(2,21)=142,9$, $p<0,0001$. (E) Análisis cuantitativo del número de células c-Fos+ en el ARCvl de ratones pertenecientes a cada grupo experimental. ANOVA de dos vías. Interacción: $F(2,21)=1,308$, n.s. Pre-tratamiento: $F(1,21)=14,43$, $p=0,0010$. Tratamiento: $F(2,21)=36,46$, $p<0,0001$. Los datos representan la media \pm SEM. Análisis *post-hoc* de Bonferroni. a, $p<0,05$ vs ratones pre-tratados con vehículo y mismo tratamiento b $p<0,05$ vs ratones con el mismo pre-tratamiento y vehículo SC.

Dado que las neuronas POMC del ARC inhiben el apetito, evaluamos el efecto de la ghrelina y la DAG sobre estas neuronas. Para este propósito, realizamos una IHQ doble contra POMC y el marcador de activación neuronal c-Fos en secciones de cerebro de ratones tratados ICV con vehículo, ghrelina o DAG, respectivamente (**Figura 41**). En comparación con el tratamiento ICV con vehículo, la DAG y la ghrelina inyectada ICV indujeron un aumento significativo en el número de neuronas POMC+/c-Fos+ que no fue diferente entre ellas. En particular, $3,2 \pm 1,0$, $6,4 \pm 0,6$ y $5,9 \pm 0,2$ % de células POMC+ fueron también c-Fos+ en el ARC de animales tratados con vehículo, ghrelina o DAG, respectivamente. Además, las células POMC+/c-Fos+ representaron un $17,7 \pm 2,8$ y $2,8 \pm 0,3\%$ de todas las células c-Fos+ dentro del ARC de ratones tratados ICV con DAG y ghrelina, respectivamente.

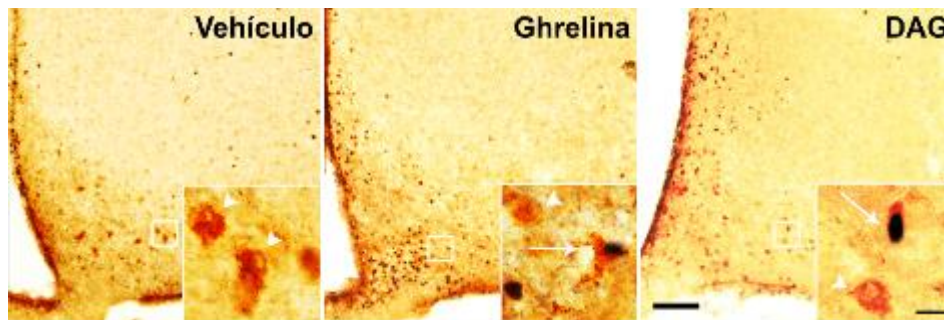


Figura 41: Activación de las neuronas POMC del ARC con el tratamiento ICV con DAG o ghrelina. El panel muestra las microfotografías representativas de la señal POMC+/c-Fos+ en secciones coronales del ARC de ratones tratados ICV con vehículo, ghrelina o DAG, respectivamente, sujetas a una IHQ doble contra POMC (señal amarronada) y c-Fos (señal negro/violeta). El inserto muestra a mayor magnificación la zona marcada en la imagen de menor aumento. Las flechas marcan las células POMC+/c-Fos+, mientras que las puntas de flecha marcan las células POMC+/c-Fos-. Barras de escala: 100 y 10 μ m para las imágenes de baja y alta magnificación, respectivamente.

DISCUSIÓN

Como mencionamos en la Introducción, la actividad del sistema ghrelina/GHSR aumenta en situaciones de déficit energético y activa una serie de mecanismos neuroendocrinos que tienen como fin estimular el apetito como así también disminuir el gasto energético y mantener la glucemia estable. En este trabajo de Tesis Doctoral usamos un modelo de ayuno en ratones para estudiar el rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la hiperfagia compensatoria y la respuesta de las neuronas CRF hipofisiotrópicas luego de un ayuno. Posteriormente, estudiamos los sitios de acción de la DAG en el cerebro y su rol modulador sobre el sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico. La realización de estos estudios ayudó a mejorar la comprensión sobre cuáles son los mecanismos moleculares y los circuitos neuronales que se activan en estos procesos. A continuación se discutirán distintos aspectos técnicos y metodológicos relacionados con la ejecución de los experimentos que forman parte de este trabajo.

Consideraciones metodológicas y técnicas de los estudios realizados.

En el desarrollo de este trabajo utilizamos ratones como modelo experimental. Dentro de los modelos animales, los ratones son los más utilizados debido a su relación filogenética y similitud fisiológica con los humanos. Asimismo, los ratones se encuentran muy bien caracterizados genéticamente, su tamaño los hace fácilmente manipulables y presentan una fácil manutención en el laboratorio. Los ratones también presentan períodos gestacionales cortos, por lo general con camadas grandes y alcanzan la madurez sexual muy pronto, lo que permite obtener varias generaciones en una menor cantidad de tiempo. Por otra parte, el uso de cepas consanguíneas permite obtener animales genéticamente definidos y estandarizados. Otra ventaja que presenta el empleo de ratones es la amplia disponibilidad de modelos genéticamente modificados que proporcionan herramientas muy útiles en el estudio de la biología humana y de patologías específicas. En este trabajo, utilizamos varios modelos de ratones modificados genéticamente como los ratones GHSR(-/-), ratones ghrelina-KO y ratones reporteros NPY-GFP. El uso de cada uno de estos modelos animales tiene sus ventajas y desventajas, las cuales repasaremos brevemente a continuación.

Los ratones GHSR(-/-) representan una herramienta valiosa para estudiar los roles fisiológicos del sistema ghrelina/GHSR. Este modelo genético posee la expresión del gen *ghsr* bloqueada por un *cassette* de bloqueo de la transcripción flanqueado por sitios loxP (Zigman et al., 2005). Este *cassette* consta de secuencias que dificultan la acción de la ARN polimerasa y tiene zonas aceptores de empalme que detienen la transcripción del ARNm que codifica para este receptor. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que estos animales expresen pequeñas cantidades de GHSR indetectables con los métodos rutinarios de medida. Considerando esta posibilidad, hubiese sido una mejor opción el empleo de ratones *knock-out* para *ghsr*, los cuales presentan una eliminación completa de este gen. Pese a esto, varios estudios llevados a cabo en ambos modelos genéticos han mostrado que ninguno de ellos responden a los efectos orexigénicos de la hormona ghrelina ni presentan inducción de c-Fos en el ARC, por lo tanto, los ratones utilizados en este trabajo pueden ser considerados como un modelo deficiente de GHSR (Zigman et al., 2005, Chuang et al., 2011). Si bien en este trabajo no realizamos una reactivación del gen, resulta importante mencionar que este modelo presenta la ventaja de que la expresión de GHSR puede ser reactivada mediante la cruce con animales que expresan la recombinasa *cre* en sitios específicos o mediante la inyección de virus que codifican esta enzima, facilitando el estudio del rol que

cumple el sistema ghrelina/GHSR en una población neuronal específica. El modelo GHSR(-/-) no posee un fenotipo evidente asociado a la ausencia de GHSR, al menos en animales alimentados *ad libitum* y criados en condiciones estándar de bioterio, lo que podría deberse a posibles efectos compensatorios en el desarrollo genético durante la etapa embrionaria (Xu et al., 2011). Es decir, que la carencia de GHSR podría inducir cambios en la expresión de otros genes relacionados que compensen esta pérdida (El-Brolosy and Stainier, 2017). Los ratones GHSR(-/-) no presentan modificaciones sustanciales en la ingesta de alimentos respecto de los ratones WT en condiciones basales, no obstante, muestran una disminución del peso corporal, que se intensifica con la edad o con la alimentación con dieta rica en grasa luego del destete (Uchida et al., 2013).

Otro modelo de ratón utilizado fueron los ghrelina-KO. Estos ratones presentan una eliminación completa del gen *preproghrelina*, por lo que no expresan la hormona ghrelina ni sus variantes moleculares. Los ratones ghrelina-KO tampoco presentan diferencias evidentes en la ingesta de alimentos y el peso corporal respecto de los ratones WT (Uchida et al., 2013). Este modelo animal ha sido exhaustivamente caracterizado mostrándose que la regulación pulsátil de GH depende en parte de la ghrelina, observándose sólo un efecto modesto en el crecimiento corporal de los ratones estudiados (Hassouna et al., 2014). La observación de este fenotipo sutil probablemente se deba a la existencia de mecanismos compensatorios inherentes al modelo genético, como mencionamos previamente.

Los animales NPY-GFP empleados en este trabajo representaron una herramienta sumamente útil en la visualización y estudio de las neuronas NPY, que de otra manera resultan muy difíciles de observar. Estos ratones fueron generados por inserción al azar en el genoma del ratón de un cromosoma bacteriano artificial que contiene la construcción con la proteína GFP bajo el promotor de NPY. Este modelo animal ha sido previamente caracterizado, mostrando un alto nivel de congruencia entre la expresión de GFP con la expresión de NPY en todo el cerebro. Además, y dado que expresan la proteína GFP distribuida libremente en el citoplasma, representó una ventaja para nuestros estudios al permitirnos visualizar en animales alimentados *ad libitum*, no sólo los somas neuronales, sino también la localización dendrítica e inervaciones axonales de estas neuronas (van den Pol et al., 2009).

Además de los ratones modificados genéticamente, utilizamos un modelo animal con una lesión neurotóxica del ARC. Este modelo animal con el ARC-lesionado ha sido extensamente utilizado para estudiar diferentes aspectos de la función hipotalámica (Perello et al., 2003, Perello et al., 2009, Cabral et al., 2014, Cabral et al., 2016, Miranda et al., 2016). Esto se debe a que es un modelo fácil de obtener, de bajo costo y de alta eficiencia. La amplia cantidad de estudios disponibles nos permitió conocer en detalle ciertas características del modelo y las precauciones que hay que tener al utilizarlo. Dado que la magnitud de la lesión hipotalámica puede ser variable, pusimos a punto un protocolo de administración que implica una única inyección SC de MSG al día postnatal 4 (Cabral et al., 2014). El glutamato es un neurotransmisor excitatorio que ejerce efectos excito-tóxicos cuando se administra en altas concentraciones. Por lo tanto, este tratamiento indujo una lesión neurotóxica exclusivamente en el ARC, manteniéndose intacta la morfología del NPV y demás áreas cerebrales. Esto se puede atribuir a que en esta zona del cerebro la barrera hemato-encefálica es más permeable en el estadio postnatal en el que se realiza la lesión, permitiendo una accesibilidad mayor del MSG al cerebro (Peruzzo et al., 2000). Una potencial desventaja

que presenta este modelo es que a medida que los animales envejecen comienzan a desarrollar alteraciones endocrino-metabólicas, entre las que se manifiestan un aumento excesivo de grasa intra-abdominal e hipofagia (Perello et al., 2003). Esta desventaja del modelo la minimizamos utilizando animales jóvenes, los cuales no presentaron diferencias significativas ni en la ingesta de alimentos ni en el peso corporal respecto a su grupo control. A pesar de sus limitaciones y de que la lesión afecta a múltiples tipos neuronales del ARC, éste modelo animal continua siendo muy utilizado en la actualidad debido a su simplicidad y robustez. Si bien el uso de modelos KO para NPY o AgRP hubiera sido una opción más precisa y específica en nuestros estudios, nuevamente están expuestos a compensaciones genéticas propias del modelo genético. Este hecho ha sido previamente reportado mostrando que la ablación neonatal de las neuronas NPY/AgRP tuvo efectos mínimos en la alimentación mientras que la ablación de estas neuronas en ratones adultos causó una rápida inanición (Luquet et al., 2005). Sin embargo, y a pesar de las compensaciones genéticas que presentan, estos ratones representaron una herramienta extremadamente valiosa en el estudio del rol de las neuronas NPY/AgRP como mediadoras de las acciones orexigenicas de la hormona ghrelina (Chen et al., 2004). De esta manera, investigaciones futuras utilizando estos modelos genéticos serian de suma utilidad para confirmar algunos de los resultados obtenidos en este trabajo. En síntesis, consideramos que el uso del modelo de ratón con el ARC-lesionado, a pesar de sus limitaciones, resultó sumamente útil para el estudio de la dependencia del ARC en la activación de las neuronas CRF del NPV inducida por ayuno.

Para generar una condición de déficit energético, usamos un ayuno de 48 horas. La longitud del tiempo de ayuno empleada se basó en estudios previos que mostraron una reducción rápida del peso corporal y un aumento tanto en el nivel de la ghrelina plasmática como en el ARNm de GHSR en el hipotálamo. Asimismo, resultó fundamental para nuestros estudios que en este modelo las neuronas CRF se encuentren activadas, permitiéndonos estudiar las interrelaciones que ocurren entre la hiperfagia compensatoria y en los mecanismos responsables de la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas ante un déficit energético. El uso del ayuno como modelo experimental presenta la ventaja de estar muy bien caracterizado en la bibliografía, es simple, de bajo costo y muy reproducible (Jensen et al., 2013). Por otra parte, esta manipulación fue bien tolerada por los ratones, los cuales mostraron en general un estado de salud bueno que se vio manifestado con un aumento de la actividad locomotora durante este período. Como mencionamos en la introducción, son muchos los contextos en donde se observan situaciones de balance energético negativo, incluyendo algunas situaciones patológicas y diferentes trastornos de la conducta alimentaria. Debido a la complejidad que tienen los trastornos de la conducta alimentaria en humanos, el desarrollo de un modelo animal apropiado que reproduzca la mayoría de las características que presentan continúa siendo un desafío. Sin embargo, cada uno de estos modelos contribuye, en algún grado, a la comprensión global de los cambios fisiológicos que ocurren en estas patologías. A sabiendas de estas limitaciones, el modelo de ayuno de 48 hs utilizado en este trabajo nos ha permitido conocer algunos aspectos neuroanatómicos y neuroendocrinológicos que pueden ser aplicados a una gran cantidad de patologías asociadas a situaciones de balance energético negativo. Sería interesante evaluar a futuro si en otras situaciones de déficit energético ocurren cambios similares a los hallados en este trabajo.

En el primer capítulo de esta Tesis Doctoral, realizamos un análisis detallado de la ingesta de

alimentos en un protocolo de ayuno-realimentación utilizando un método manual de pesada y uno automatizado. Los métodos manuales de pesada presentan la ventaja de ser simples, rápidos, controlados, de no depender de un equipo y de permitirnos utilizar un mayor número de animales en cajas individualizadas. No obstante, dichos métodos son laboriosos, requieren de un seguimiento continuo y de una mayor cantidad de tiempo a la hora de realizarlo, están expuestos al error humano en el registro de los datos y presentan algunas fuentes de variabilidad debido a que los ratones deben ser manipulados, retirados de sus jaulas y colocados en un entorno novedoso diariamente. De manera contraria, los métodos automatizados de pesada realizados en cajas metabólicas, presentan la ventaja de ser simples, de poseer un manejo remoto y automatizado que le requieren una menor cantidad de tiempo al operario, tienen la ventaja de no tener la necesidad de manipular ni retirar a los ratones de sus jaulas, de poder detectar y medir en tiempo real los parámetros estudiados permitiéndonos obtener un registro más detallado de los mismos durante la totalidad del experimento, de poder evaluar varios parámetros circadianos y ampliar los estudios con parámetros como la actividad locomotora y la ingesta de agua dentro de ella. Por otro lado, los métodos automatizados tienen la desventaja de ser muy costosos, de depender de un equipo y de un software especializado que quedan expuestos a errores indetectables, de limitar el número de animales experimentales al número de cajas disponibles, de no poseer un registro de peso corporal confiable y de requerir una mayor cantidad de tiempo de adaptación al nuevo ambiente por las diferencias asociadas a las jaulas de alojamiento y experimentales. En nuestro caso, ambos métodos de medida arrojaron resultados similares en la ingesta diaria de alimento durante la hiperfagia compensatoria. Sin embargo, el método automatizado de pesada nos permitió, además, mostrar que ocurre un cambio en el patrón de consumo de alimento posterior a un ayuno.

Las determinaciones del ARNm las realizamos mediante micro-disecciones de ARC utilizando la técnica de micro-punción de Palkovits (Palkovits, 1973, 1983), la cual se basa en la extracción de pequeños cilindros de tejido para aislar una porción enriquecida del núcleo cerebral de interés siguiendo las coordenadas establecidas en el Atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). Si bien es una técnica desarrollada hace varios años, es simple, rápida, de bajo costo, la cual puede ser utilizada para extraer muestras tanto de tejidos congelados como frescos. Actualmente existen técnicas más modernas como la captura por micro-disección laser, la cual permite la preparación de muestras automatizada a través del aislamiento de un área o incluso de células específicas de una población mixta bajo visualización microscópica. La captura por micro-disección laser es una técnica muy precisa y confiable, pero se encuentra limitada por la necesidad de equipos muy costosos para su realización, los tiempos de procesamiento son muy largos y de bajo rendimiento, y se necesitan operadores experimentados. Además, esta técnica requiere la fijación o congelación del tejido, lo que resulta en una muestra no viable que restringe los análisis posteriores (Espina et al., 2006). Otra herramienta importante para la determinación de ARNm es la técnica de hibridación *in-situ*, la cual permite la detección de una secuencia de ARNm de interés mediante una secuencia de nucleótidos complementaria o sonda, permitiendo obtener información de la expresión génica manteniendo el contexto morfológico de la muestra, es decir, preservando la integridad a nivel celular y tisular, brindando interpretaciones anatómicas más precisas. Asimismo, el uso de la hibridación *in-situ* presenta la ventaja de poder ser combinada con técnicas IHQs que proporcionan información histológica adicional al permitir detectar los niveles de

expresión génica sobre diferentes fenotipos neuronales. Sin embargo, la hibridación *in-situ* presenta la limitación de que el procesamiento rutinario del tejido requiere de excesivos cuidados, suele ser difícil de estandarizar y en muchos casos se pierde sensibilidad en la detección de transcritos de ARNm de baja abundancia. Por lo tanto, a pesar de que la técnica utilizada en este trabajo no nos permitió obtener información morfológica específica de la expresión génica, consideramos que nos brindó simplicidad, rapidez y elevada sensibilidad en los resultados obtenidos.

En este trabajo utilizamos frecuentemente la presencia de inmuno-reactividad contra c-Fos como un índice de activación neuronal. C-Fos es el factor de transcripción perteneciente a la familia de genes de expresión temprana mayormente utilizado como marcador de la activación neuronal. En la mayoría de las células ocurre la transcripción del ARNm del gen *c-fos* ante un estímulo determinado, alcanzando un pico máximo aproximadamente a los 30 minutos después del inicio del estímulo. La posterior expresión de la proteína c-Fos ocurre más tarde y de manera transitoria, alcanzando un pico máximo aproximadamente a los 90-120 minutos después del estímulo (Kovacs, 1998). Por lo tanto, y debido a que la resolución temporal de c-Fos es limitada, resulta importante tener en cuenta estos aspectos al momento de diseñar los protocolos experimentales para evitar la variabilidad de los niveles obtenidos y un posible enmascaramiento del efecto del estímulo realizado. La principal ventaja que posee c-Fos como marcador de activación neuronal es que resulta altamente sensible y fácilmente identificable en neuronas estimuladas. Además, la expresión basal de c-Fos es muy baja y, al existir una amplia disponibilidad de anticuerpos específicos en el mercado, se facilita su utilización como técnica rutinaria. En base a esto, al ser un marcador de activación nuclear, puede ser fácilmente combinado con otras técnicas IHQs de marcación citoplasmática para evaluar la activación transcripcional en poblaciones neuronales específicas (Kovacs, 2008). A pesar de que c-Fos es un marcador de activación neuronal inespecífico, su utilización resultó sumamente útil en nuestros estudios debido a que en la literatura están bien establecidos los cambios en la actividad neuronal en el ARC y en el NPV en respuesta a las administraciones de ghrelina en roedores (Hewson and Dickson, 2000, Ruter et al., 2003, Kobelt et al., 2008, Cabral et al., 2014). Es importante tener en cuenta que la expresión de c-Fos también se puede dar en células activadas indirectamente por los circuitos neuronales que regula la hormona ghrelina (Edwards and Abizaid, 2017). Otro aspecto a considerar es que la falta de expresión de c-Fos no necesariamente indica que un determinado grupo celular no esté implicado en la respuesta a un estímulo o incluso que se haya activado eléctricamente, de forma tal que no haya cambios en los niveles de este marcador debe ser interpretado cuidadosamente (Kovacs, 2008).

Para detectar la presencia de GHSR, utilizamos una variante fluorescente de ghrelina denominada F-ghrelina. Debido a que GHSR posee una elevada homología estructural en sus 7TM con los demás receptores acoplados a proteína G, no existe a la fecha anticuerpos específicos y confiables que puedan ser utilizados para su estudio. Los extremos C- y N-terminal de GHSR serían dianas interesantes para la generación de anticuerpos ya que sus estructuras son más específicas en cada receptor. Sin embargo, la región C-terminal depende ampliamente de la activación de las rutas de señalización intracelulares, resultando una región inadecuada para la generación de anticuerpos específicos. De manera complementaria, la región N-terminal se presenta como una región peptídica muy corta que genera una baja especificidad debido a la dificultad de unión de un anticuerpo. Si bien existen en el mercado varios

anticuerpos dirigidos contra GHSR, es conocido en el campo de la ghrelina que ninguno de ellos es adecuado para detectar específicamente la presencia de este receptor mediante técnicas IHQs. Por lo tanto, algunas alternativas para visualizar las células que expresan GHSR incluyen el uso de técnicas de hibridación *in-situ* o el uso de ratones modificados genéticamente que expresen GFP bajo el control del promotor del gen *ghsr* (GHSR-eGFP). Como se indicó anteriormente, la técnica de hibridación *in situ* nos permitiría la detección del ARNm de GHSR, sin embargo, nos limita en el estudio de los niveles proteicos de GHSR a nivel celular. Por el otro lado, el ratón GHSR-eGFP brinda la ventaja de poder visualizar fácilmente las poblaciones neuronales donde se expresa el GHSR, sin embargo, su uso en este trabajo no resultó viable debido al bajo nivel reportado de co-expresión de la proteína reportera eGFP con el ARNm de GHSR en el hipotálamo (Mani et al., 2014). Por esta razón, en este trabajo de Tesis Doctoral utilizamos un ensayo de unión de F-ghrelina como herramienta para evidenciar indirectamente la presencia de GHSR. La F-ghrelina es un análogo de ghrelina con una incorporación de una molécula fluorescente en su extremo C-terminal que retiene su capacidad de unión a GHSR y muestra una bioactividad similar a la ghrelina intacta (Leyris et al., 2011, McGirr et al., 2011, Cabral et al., 2013). La puesta a punto del uso de F-ghrelina como trazador requirió la realización de varios controles de especificidad que describimos en detalle en un artículo de nuestro laboratorio (Cabral et al., 2013). El uso de esta técnica nos dio la posibilidad de ampliar los resultados obtenidos con las determinaciones de ARNm estudiando los niveles proteicos de GHSR tanto a nivel somático como pre-sináptico en el cerebro sin la necesidad de utilizar un anticuerpo para su detección. Además, por todo lo anteriormente dicho, utilizamos un análogo de la DAG fluorescente para detectar la presencia de su receptor por unión del ligando. Esta técnica fue extremadamente valiosa en el desarrollo de este trabajo, debido a que en la actualidad el receptor de DAG es aún desconocido.

Otro punto importante en el desarrollo de este trabajo fue la utilización de IHQs para visualizar las neuronas peptidérgicas. Dichas neuronas almacenan los neuropéptidos sintetizados en gránulos secretorios que envían a sus terminales axonales para su posterior liberación. Como muchos de los anticuerpos utilizados contra los neuropéptidos reconocen el péptido maduro, la señal-IR se visualiza generalmente con una localización en fibras y muy pocos cuerpos neuronales. Una estrategia muy utilizada para visualizar los cuerpos de neuronas peptidérgicas consiste en pre-tratar a los animales con colchicina, un fármaco antimitótico que inhibe la polimerización de los microtúbulos uniéndose a la tubulina. El pre-tratamiento con colchicina bloquea el transporte vesicular, generando una acumulación peptídica en los cuerpos neuronales permitiendo su visualización mediante IHQ (Kreutzberg, 1969). Dado que la colchicina constituye por sí mismo un estímulo estresante que resulta en la inducción de c-Fos en el cerebro (Ceccatelli et al., 1989), no es posible el estudio de la activación neuronal durante el ayuno mediante dobles tinciones en estas condiciones. Sin embargo, la producción peptídica elevada de varios neuropéptidos con el ayuno nos permitió la visualización directa de los cuerpos neuronales sin la necesidad de realizar ninguna estrategia adicional.

Todas las metodologías y técnicas utilizadas en este trabajo de Tesis Doctoral, a sabiendas de sus ventajas y desventajas, nos permitieron un abordaje adecuado de los objetivos estipulados tratando de que las limitaciones de algunas de las técnicas utilizadas fueran suplidas por las ventajas de otras.

Capítulo 1. Estudio del rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la hiperfagia compensatoria inducida por ayuno.

En el primer capítulo de este trabajo confirmamos que los ratones realizan una hiperfagia compensatoria luego de un evento de ayuno severo. La hiperfagia observada se mantuvo durante varios días y luego los animales retornaron a sus niveles basales de consumo de alimento diario, tal como había sido previamente reportado (Erickson et al., 1996, Pedroso et al., 2016). Asimismo, resultó interesante observar que la cantidad extra de calorías ingeridas durante el período de hiperfagia compensó la cantidad de calorías que los ratones no consumieron durante el período de ayuno. Esto sugiere que la hiperfagia compensatoria desarrollada dependería principalmente del control homeostático de la alimentación y de los circuitos neuronales hipotalámicos que se encuentran estrechamente relacionados con el control del balance energético.

Los ratones expuestos a un protocolo de ayuno-realimentación aumentaron su consumo de alimento durante la fase de luz y la disminuyeron durante la fase de oscuridad durante los primeros 5 días de hiperfagia, en comparación con el consumo de alimento de ratones alimentados *ad libitum*. Por otro lado, los patrones de actividad locomotora mostraron un cambio que se manifestó en un aumento de la actividad preferencialmente en la fase de luz durante el ayuno y una marcada hipoactividad durante los primeros 3 días de realimentación principalmente en la fase de oscuridad. Estos resultados son respaldados por trabajos previos en los cuales también observaron un aumento de la actividad durante la fase de luz en ratones ayunados (Williams et al., 2002, Kanizsai et al., 2009). Estas observaciones se podrían asociar principalmente a un comportamiento de búsqueda de comida durante el período de luz (Gelegen et al., 2006). De manera contraria, la reducción de la actividad locomotora observada durante la realimentación podría estar contribuyendo en gran medida a la disminución del gasto energético, el cual, asociado a un estado de hiperfagia, es consistente con el aumento del peso corporal observado en la misma ventana temporal.

En este trabajo, también corroboramos que los niveles de ghrelina en plasma aumentan durante un ayuno, tal como había sido reportado previamente (Ariyasu et al., 2001, Guo et al., 2008, Goldstein et al., 2011). Asimismo, observamos un incremento en los niveles de DAG en plasma, observando que la relación DAG:ghrelina se mantuvo constante con el ayuno. Esto sugeriría que el déficit energético incrementa los niveles de ghrelina plasmática, la cual, por desacilación, genera DAG. La DAG, a su vez, debería eliminarse en la misma proporción para mantener la relación DAG:ghrelina estable. Por otro lado, observamos una rápida disminución en los niveles plasmáticos de ambos péptidos con el comienzo de la realimentación, lo cual resulta esperado debido su corta vida media en circulación (Akamizu et al., 2004). El descenso de la ghrelina en el período post-prandial se encuentra asociado a la cantidad de calorías consumidas, indicando un papel relevante de la composición de los alimentos consumidos como reguladores de los niveles de ghrelina en plasma (Muller et al., 2015). De igual manera, estudios previos respaldan nuestras observaciones mostrando que los valores de ghrelina en plasma vuelven a los valores basales a las pocas horas de realimentación en ratas ayunadas (Guo et al., 2008, Zizzari et al., 2011, Steyn et al., 2012). Por otro lado, también obtuvimos una disminución en plasma tanto de la glucosa como de los triglicéridos, los cuales también retornaron a los valores basales con la realimentación, tal como

había sido reportado previamente (Kmiec et al., 2005). Estos resultados fueron esperables debido a que, como habíamos mencionado en la Introducción, el ayuno conduce a una respuesta hormonal y metabólica adaptativa, que incluye en primer lugar el consumo de los hidratos de carbono y una consecuente disminución de la glucosa circulante, para luego comenzar a utilizar los ácidos grasos y cetonas en la producción de energía.

En este trabajo también estudiamos el impacto que genera el protocolo de ayuno-realimentación sobre la expresión hipotalámica de GHSR. Estudios previos ya habían reportado que el nivel de ARNm de GHSR se encuentra elevado en extractos de hipotálamo de roedores ayunados (Kim et al., 2003, Luque et al., 2007, Henry et al., 2015). En este trabajo de Tesis Doctoral ampliamos estos resultados realizando un estudio neuroanatómico detallado de los núcleos hipotalámicos en donde ocurre este aumento. De esta manera, encontramos que tanto el nivel de ARNm de GHSR como los sitios de unión a ghrelina aumentaron en el ARC de ratones ayunados, sugiriendo que el aumento de la expresión génica efectivamente culminó en la biosíntesis proteica de GHSR. Este aumento del nivel del ARNm de GHSR en el ARC se correlaciona con algunos estudios previos llevados a cabo en ratones y ratas ayunadas (Nogueiras et al., 2004, Lopez Soto et al., 2015). Además, estudios más recientes, han mostrado que la expresión del ARNm de GHSR aumenta ~3,4 veces con el ayuno exclusivamente en las neuronas NPY/AgRP de este núcleo (Henry et al., 2015, Yasrebi et al., 2016). El uso de la técnica de unión de F-ghrelina nos permitió inferir la localización celular de GHSR, mostrando que este receptor aumentaría principalmente en una localización pre-sináptica. Por otro lado, pudimos mostrar que el número de células fluoresceína+ no se vio modificado con el ayuno, mostrando un patrón de células consistente con los estudios anteriores de distribución del ARNm de GHSR en el cerebro de ratón (Zigman et al., 2006). La unión de ghrelina ya ha sido documentada previamente en terminales sinápticas GABAérgicas y de NPY dentro del ARC y de sus núcleos blanco (por ejemplo, el NPV), donde los canales de calcio pre-sinápticos regulan la vía de liberación de neurotransmisores (Cowley et al., 2003, Atasoy et al., 2012, Lopez Soto et al., 2015, Cabral et al., 2016). Sin embargo, el aumento de GHSR en terminales pre-sinápticas dentro del ARC con el ayuno no había sido reportado hasta ahora. Consideramos que estos resultados deberían ser corroborados en un futuro mediante IHQs dobles contra marcadores pre-sinápticos.

Las neuronas NPY/AgRP expresan altos niveles de GHSR y son un blanco clave en la señalización de la ghrelina. Dado que los niveles de GHSR en el ARC y los niveles de ghrelina en plasma aumentan durante el ayuno, estudiamos si dichos cambios afectan la biosíntesis de estos neuropéptidos en el ARC. El ayuno incrementó los cuerpos celulares NPY+ y AgRP+ en el ARC sin la necesidad de realizar ningún tratamiento para mejorar su visualización. Estas observaciones, junto con el hecho de que los niveles de ARNm de NPY y de AgRP también incrementaron con el ayuno, nos permiten sugerir que la biosíntesis peptídica de estos neuropéptidos se encuentra incrementada. Por lo tanto, y dado que el nivel de ARNm y el número de células POMC+ disminuyeron con el ayuno, podríamos inferir que el incremento de la señalización de GHSR inducido por ayuno promueve la activación de las neuronas NPY/AgRP del ARC, las cuales, a su vez, inhiben a las neuronas POMC del mismo núcleo (Cowley et al., 2003, Atasoy et al., 2012).

Por otro lado, resultó interesante observar que el nivel de ARNm de GHSR volvió a los niveles

basales al segundo día de realimentación, mientras que la densidad de los sitios de unión a F-ghrelina dentro del ARC continuó elevada y retornó a los niveles basales recién al cuarto día de realimentación. Del mismo modo, el nivel de NPY se mantuvo elevado durante este mismo período de tiempo, mientras que el nivel de POMC volvió inmediatamente a sus niveles basales al finalizar el ayuno. Según nuestra revisión bibliográfica, la vida media *in vivo* del ARNm y de la proteína de GHSR no ha sido estudiada previamente. Dado que la vida media de otros receptores acoplados a proteína G como el receptor k-opioide ha sido estimada en varios días (Polter et al., 2017) es razonable pensar que el ARNm de GHSR en el ARC vuelve a valores basales cuando el período de ayuno termina, mientras que los niveles proteicos de GHSR permanecen elevados por un período de tiempo más prolongado. En este caso, podríamos inferir sobre la existencia de algún mecanismo de regulación a nivel post-traducciona compensatorio de estabilización de GHSR que lo proteja de la degradación o del reciclado. El incremento de los niveles de GHSR en neuronas NPY/AgRP del ARC durante los primeros 4 días de realimentación podrían impactar sobre la biosíntesis de NPY y AgRP y, en consecuencia, ser los responsables del elevado consumo de alimento durante este período.

Con la finalidad de estudiar si los cambios neuronales y comportamentales que ocurren con el ayuno dependen de la señalización del sistema ghrelina/GHSR, manipulamos este sistema mediante dos estrategias complementarias: una genética, utilizando animales GHSR(-/-) y ghrelina-KO, y otra farmacológica, utilizando animales WT tratados con moduladores específicos de GHSR. Los animales GHSR(-/-) expuestos a un protocolo de ayuno-realimentación también mostraron una hiperfagia compensatoria inducida por ayuno; sin embargo, ésta fue un 15% menor cuando se comparó el consumo de alimento acumulado durante todo el período de realimentación respecto al de sus hermanos WT, no observándose diferencias sustanciales en los pesos corporales. Estos resultados no son inesperados, ya que existen varios sistemas hormonales (como la leptina, (Pedroso et al., 2016)) y metabólicos (como la glucosa (Becskei et al., 2008b)) que se encuentran involucrados en mecanismos responsables de la ingesta de alimentos relacionadas a la homeostasis del peso corporal (Karatsoreos et al., 2013). Por otro lado, es importante resaltar que la diferencia en la ingesta de alimentos entre los distintos genotipos fue estadísticamente significativa solo cuando realizamos la comparación de los valores acumulados en los 5 días de realimentación y no cuando se compararon las ingestas diarias. Esto probablemente se deba a que las diferencias asociadas a los distintos genotipos son pequeñas y nos dificultan la capacidad de detectar diferencias sutiles en la ingesta diaria (Ellacott et al., 2010). A su vez, tal como hemos mencionado en la Introducción de este trabajo, ha sido reportado que el estrés afecta los comportamientos relacionados con el consumo de alimento y que la señalización de ghrelina modula la respuesta al estrés (Chuang et al., 2011, Cabral et al., 2012, Spencer et al., 2012). Por lo tanto, la menor hiperfagia inducida por ayuno observada en animales GHSR(-/-) podría resultar de una diferente susceptibilidad al estrés inducido por ayuno en estos animales. Es importante mencionar que otros autores como Sun *et al.* no han detectado diferencias en el consumo de alimento entre animales WT y GHSR(-/-) expuestos a un protocolo de ayuno-realimentación similar al que usamos en este trabajo (Sun et al., 2008). Sin embargo, este estudio fue realizado con animales previamente alimentados con dieta alta en grasa que pesaban alrededor de 40-45g, mientras que en nuestro trabajo usamos ratones jóvenes de 22-25g de peso corporal alimentados con dieta estándar para roedores. Dado que los ratones obesos o de edad avanzada son menos propensos

a adaptarse a cambios metabólicos (Steinhagen-Thiessen et al., 1981), es posible pensar que estas diferencias puedan explicar los distintos resultados obtenidos en ambos experimentos.

Los animales GHSR(-/-) ayunados mostraron menores incrementos en los niveles de NPY, de AgRP y en la activación neuronal indicada por c-Fos, respecto de sus hermanos WT en las mismas condiciones experimentales. Esto implicaría que la señalización del sistema ghrelina/GHSR es necesaria para la activación completa del ARC ante un evento de ayuno, lo cual impactaría sobre la biosíntesis peptídica de NPY/AgRP desencadenando, a su vez, un menor consumo de alimento durante el período de realimentación. De forma complementaria a este estudio, utilizamos ratones de la cepa NPY-GFP (van den Pol et al., 2009) los cuales cruzamos con ratones GHSR(-/-) para generar animales GHSR(-/-)/NPY-GFP. Como mencionamos anteriormente, las neuronas NPY no son fáciles de identificar morfológicamente en un animal alimentado y por ello el empleo de esta cepa resultó sumamente valiosa para la visualización y estudio de estas neuronas. Dado que, como comentamos previamente, esta cepa reportera se generó por la inserción al azar de un cromosoma bacteriano artificial conteniendo una construcción con la proteína GFP bajo el promotor de NPY, podría haber sido posible la pérdida de las secuencias reguladoras del gen de NPY durante la inserción del transgen. Sin embargo, el ayuno incrementó la medida de intensidad de señal fluorescente verde en el ARC lo que podría indicar que efectivamente ocurrió un incremento transcripcional del gen *npy* y en consecuencia, un aumento en la biosíntesis de este péptido en el ARC. Por lo tanto, todas estas observaciones nos permitieron inferir que la señalización del sistema ghrelina/GHSR es requerida para desarrollar un evento hiperfágico completo luego de un ayuno.

Debido a que los animales GHSR(-/-) pueden presentar compensaciones propias del modelo genético, utilizamos, además, animales WT tratados con moduladores específicos de GHSR. De acuerdo a lo mencionado en la Introducción de este trabajo, estudios *in vitro* usando sistemas de expresión heteróloga mostraron que GHSR presenta una elevada e inusual actividad constitutiva a través de la cual activa cascadas de señalización intracelulares con aproximadamente el 50% de su capacidad máxima en ausencia de la ghrelina (Holst et al., 2003, Damian et al., 2012, Lopez Soto et al., 2015, Mustafa et al., 2017). También se ha reportado que la señalización constitutiva afecta la secreción de GH en adenomas somatotropos humanos *in vitro* (Mear et al., 2013). Sin embargo, aún es desconocido si esta señalización de GHSR independiente de la ghrelina juega un rol *in vivo*. Como ya mencionamos, se conocen algunas mutaciones naturales de GHSR en humanos que bloquean su actividad constitutiva y están asociadas a un síndrome familiar de baja estatura, sugiriendo que la actividad constitutiva de GHSR podría ser fisiológicamente relevante (Pantel et al., 2006, Inoue et al., 2011). Además, se ha mostrado previamente que algunas manipulaciones genéticas y farmacológicas del sistema ghrelina/GHSR en modelos animales han generado evidencias circunstanciales de que la actividad constitutiva de GHSR participaría en la regulación del consumo de alimento y del peso corporal. Sin embargo, estas observaciones han sido inconsistentes en condiciones de alimentación *ad libitum*.

Nuestros resultados mostraron que los ratones ghrelina-KO y los ratones administrados centralmente con dos antagonistas de GHSR, diferentes y no relacionados entre sí, presentaron una hiperfagia compensatoria similar a la de los ratones administrados con vehículo luego de un evento de ayuno. Algunos estudios previos en los que se utilizaron diferentes estrategias farmacológicas (por

ejemplo, administraciones con aptámeros del ARN de ghrelina, anticuerpos anti-ghrelina, antagonistas de GHSR) mostraron que la acción de la ghrelina endógena es requerida para la hiperfagia inducida por ayuno (Nakazato et al., 2001, Becskei et al., 2008a, Mayorov et al., 2008, Perello et al., 2010, Zakhari et al., 2012, Thomas et al., 2016). La razón de las discrepancias encontradas entre los estudios previos y nuestro trabajo es desconocida, aunque posiblemente pueda atribuirse al diseño experimental usado en cada caso (por ejemplo, dosis utilizadas, administración, protocolo) el cual es un factor crítico que impacta en los resultados. A nuestro entender, los estudios previos no han sido realizados con el cuidado necesario como para descartar que haya efectos adversos de los ligandos de GHSR y bloqueadores de ghrelina utilizados. La toxicidad es siempre una preocupación cuando las drogas se administran centralmente y es especialmente relevante cuando se estudia un efecto inhibitorio sobre la ingesta, ya que el mismo podría ser secundario a los efectos adversos de la manipulación farmacológica. En nuestro trabajo, pusimos cuidadosamente a punto las dosis a utilizar y tratamos a los ratones con la máxima dosis de antagonistas que no produjeron toxicidad, para descartar cualquier efecto no específico de los compuestos sobre la ingesta de alimentos. Bajo estas condiciones experimentales, los antagonistas de GHSR bloquearon de manera parcial el efecto orexigénico de ghrelina administrada exógenamente. El hecho de que dos antagonistas de GHSR no relacionados y que también la deficiencia de la ghrelina endógena no afecten la hiperfagia compensatoria inducida por ayuno, sugiere que la activación de GHSR evocada por ghrelina no es requerida para este tipo de comportamiento.

De manera interesante, encontramos que los ratones que fueron administrados centralmente con el péptido K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ presentaron una hiperfagia compensatoria menor en comparación con los animales tratados con vehículo. Es importante destacar que el grado en el que este tratamiento impactó en la actividad constitutiva de GHSR no se puede medir directamente, sin embargo, la observación de que los ratones WT tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ y los ratones GHSR(-/-) mostraran una reducción similar en la hiperfagia inducida por ayuno sugiere que este compuesto podría estar afectando exclusivamente la actividad de GHSR. Es interesante destacar que los ratones ayunados fueron tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ durante el período de ayuno y que, debido a ello, presentaron menores incrementos proteicos de NPY, AgRP y c-Fos en el ARC al final del período de ayuno. Esto nos sugiere que la actividad de GHSR parece tener un rol importante durante los períodos de ayuno y realimentación. El hecho de que el péptido K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ no afectó el consumo de alimento nocturno en animales GHSR(-/-) remarca que los efectos fueron específicos. Cabe destacar que el K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ bloquea parcialmente el consumo de alimento inducido por ghrelina, sugiriendo que este ligando también presenta propiedades de antagonista. Dada la alta actividad constitutiva de GHSR, se deberían tener en cuenta tanto las propiedades como antagonistas y como agonistas inversos cuando se testean ligandos de GHSR como potenciales drogas de uso clínico.

En este trabajo, encontramos algunas evidencias de que la disminución de la señalización de GHSR en ratones disminuye la hiperfagia posterior a un evento de ayuno. Sin embargo se necesitarán más estudios para probar si la señalización de GHSR también contribuye en los mecanismos que controlan el peso corporal luego de una restricción calórica severa. En base a esto, resulta interesante mencionar un estudio reciente donde mostraron que la supresión de la señalización de ghrelina en ratones obesos previene el efecto rebote en el peso corporal posterior a una dieta, un problema muy común en la

actualidad (Chen et al., 2017). Por lo tanto, los tratamientos que bloquean la señalización constitutiva de GHSR podrían ayudar a mantener un consumo de alimento reducido luego de una dieta para contribuir en el mantenimiento del peso corporal a largo plazo en pacientes obesos expuestos a una dieta (Cameron et al., 2014). También, se necesitarían estudios adicionales para probar si la supresión de la señalización del sistema ghrelina/GHSR es además útil para tratar otros trastornos de la conducta alimentaria relacionados a este sistema, como los trastornos por atracón (Geliebter et al., 2008, Valdivia et al., 2015). Así, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral utilizando modelos animales podrían ser útiles para diseñar nuevos estudios que ayuden a generar aplicaciones clínicas del sistema ghrelina/GHSR en un futuro cercano.

Capítulo 2. Estudio del rol modulador de la señalización del sistema ghrelina/GHSR en la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas en una condición de ayuno

El eje HHA es uno de los ejes neuroendocrinos más importantes encargados de mantener la homeostasis corporal, siendo las neuronas CRF del NPV las principales responsables de la estimulación del eje. Ante una situación de ayuno severo, la activación de este eje es relevante, por ejemplo, para el reclutamiento de los mecanismos responsables del mantenimiento de la glucemia. Durante el desarrollo de este trabajo, encontramos que tanto la producción de CRF en el NPV como los niveles de glucocorticoides en plasma aumentaron durante el ayuno de 48 hs. Estudios previos ya habían mostrado que el nivel de ARNm de CRF aumenta en el hipotálamo de roedores ayunados por 48 hs (Luque et al., 2007); sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral muestran que también ocurre un aumento en la síntesis peptídica de CRF. La activación del eje HHA que observamos en los ratones ayunados parece depender directamente de la activación de las neuronas CRF debido a que dichas neuronas no se encontraron transcripcionalmente inhibidas por los mecanismos de retro-inhibición negativa que median los glucocorticoides. Estos mecanismos resultan fundamentales en la finalización de la respuesta del eje HHA, y han sido identificadas dos tipos de respuestas en distintas ventanas temporales: una rápida, en la que los glucocorticoides inhiben la secreción de CRF desde el NPV y de ACTH en la hipófisis anterior; y una retardada, que implica la inhibición inducida por los glucocorticoides de la expresión de CRF en el NPV, como así también la supresión de la transcripción del gen POMC, precursor de ACTH, en las células corticotropas hipofisarias (Tasker and Herman, 2011, Gjerstad et al., 2018). Cabe mencionar que otros estudios han mostrado una elevación de los glucocorticoides plasmáticos ante un evento de ayuno menos prolongado, sin encontrar aumentos del ARNm de CRF en el hipotálamo, posiblemente como consecuencia de la retro-inhibición negativa ejercida por los glucocorticoides (Watts, 2005, Luque et al., 2007). En base a esto, nuestras observaciones sugerirían que el eje HHA se encuentra activado durante un ayuno de 48 hs debido a la activación de las neuronas CRF que presentan una desensibilización a la acción inhibitoria de los glucocorticoides.

Ha sido ampliamente reportado en la literatura que el NPV se encuentra fuertemente regulado por inervaciones provenientes del ARC, uno de los principales núcleos orquestadores del balance energético de los organismos (Jobst et al., 2004, Atasoy et al., 2012, Krashes et al., 2014). Particularmente, las

neuronas NPY/AgRP inervan a las neuronas CRF para modular su función (Liposits et al., 1988). Por ejemplo, algunos estudios han mostrado que la administración de NPY en ratas incrementa rápidamente la síntesis y liberación de CRF así como también los niveles plasmáticos de corticosterona (Suda et al., 1993, Dimitrov et al., 2007). Por esta razón, y debido a que en el primer capítulo de este trabajo observamos que con un ayuno de 48 hs ocurre un aumento en la biosíntesis peptídica de NPY/AgRP en el ARC, en esta segunda parte estudiamos si la activación de las neuronas CRF hipofisiotrópicas con el ayuno es consecuencia de un aumento del tono de NPY/AgRP al NPV. Estudios previos respaldan esta posibilidad al mostrar que ratones NPY(-/-) muestran un menor nivel de ARNm para CRF en respuesta a un ayuno de 48 hs (Luque et al., 2007). Para evaluar esta hipótesis, realizamos un análisis cuantitativo digital de las proyecciones NPY/AgRP en la zona compacta del NPV enriquecida en neuronas CRF de ratones sometidos a un ayuno de 48 hs. Para esto, utilizamos técnicas IHQs contra cada neuropéptido y, en estas condiciones, observamos que la intensidad y el área de la señal NPY+ y AgRP+ aumentaron con el ayuno en el NPV. Estos resultados se condicen con estudios previos que reportaron un aumento de la liberación de NPY en explantes de NPV de ratones sometidos a un déficit energético (Dube et al., 1992). Nuestras observaciones no nos permiten discriminar si durante el ayuno aumenta el número de nuevas inervaciones desde el ARC al NPV o si fibras pre-existentes provenientes del ARC comienzan a ser detectadas debido al aumento de la biosíntesis peptídica observada en el ARC. Para discriminar entre estas dos posibilidades, utilizamos nuevamente a los ratones NPY-GFP. Como detallamos anteriormente, este modelo presenta la ventaja de que todas las neuronas NPY en el ARC y sus proyecciones son visualizadas independientemente si los animales se encuentran alimentados o ayunados (**Figura 14**). Nuestros resultados indicaron que tanto la intensidad como el área de las aferencias neuronales GFP+ en el NPV aumentaron durante el ayuno en estos animales, indicando que el ayuno no sólo aumenta la biosíntesis de los principales neuropéptidos orexigénicos del ARC, sino que también induciría la formación de nuevas inervaciones axonales desde el ARC hacia el NPV. Estos resultados son congruentes con algunos estudios recientes que han sugerido que los circuitos neuronales hipotalámicos pueden ser muy versátiles para adaptarse a diferentes situaciones de balance energético (Zeltser et al., 2012, Khan et al., 2014, Klockars et al., 2018). Particularmente, se ha mostrado que tanto las neuronas POMC como las neuronas NPY/AgRP del ARC muestran una importante plasticidad sináptica en respuesta al estado metabólico (Dietrich and Horvath, 2013). Además, el ayuno también aumenta el número de espinas dendríticas en las neuronas NPY/AgRP las cuales disminuyen gradualmente cuando los animales son realimentados (Yang et al., 2011, Liu et al., 2012). Esto nos permite inferir que ante un desafío homeostático, como el ayuno, los circuitos neuronales que conectan el ARC con el NPV serían capaces de mostrar respuestas dinámicas para readaptar su capacidad de respuesta y promover la supervivencia en situaciones de baja disponibilidad de nutrientes. Por este motivo, resultaría sumamente interesante complementar nuestras observaciones con el uso de otras metodológicas como experimentos de marcación retrógrada o anterógrada con compuestos fluorescentes o mediante el uso de trazadores neuronales de origen viral.

Un aspecto importante a destacar es que la intensidad y el área de señal-IR de las fibras POMC+ en el NPV no fue diferente entre animales alimentados y ayunados a pesar de haberse encontrado disminuido el nivel de POMC en el ARC de los ratones ayunados. El hecho de que la síntesis de POMC

disminuye en el ARC en condiciones de ayuno ya había sido mostrado previamente (Perello et al., 2007), la cual se debe, en parte, a la inhibición GABAérgica que las neuronas NPY/AgRP ejercen sobre ellas (Cowley et al., 2001, Tong et al., 2008). La razón por la que no detectamos un descenso en el nivel de POMC en el NPV de los animales ayunados es desconocida. A pesar de no poder descartar una dificultad técnica en el diseño experimental usado, como por ejemplo, sensibilidad del anticuerpo utilizado o la forma de revelado del mismo, estudios previos han mostrado que la secreción de POMC y ACTH en extractos hipotalámicos al igual que su concentración en el líquido cefalorraquídeo disminuyen en ratas que fueron ayunadas, sugiriendo que la secreción de dichos péptidos podría disminuir durante el ayuno (Pritchard et al., 2003). Además, Cyr *et al.* han mostrado que la administración central de NPY inhibe el clivaje de POMC a α -MSH y su posterior liberación en el NPV (Cyr et al., 2013). Por lo tanto, y dado que durante el ayuno ocurre un incremento de la biosíntesis de NPY en el ARC y un aumento de sus proyecciones hacia el NPV, es razonable proponer que el aumento del tono de NPY podría estar inhibiendo no sólo la síntesis de POMC sino también su liberación en el NPV, generando una acumulación del mismo en las terminales sinápticas.

Para determinar si el aumento de la biosíntesis y la activación de las neuronas CRF es consecuencia del aumento de las inervaciones de las neuronas NPY/AgRP del ARC al NPV, utilizamos animales con el ARC-lesionado. Tal como fue mostrado en la sección de resultados, utilizamos animales jóvenes, con valores de ingesta de alimento y peso corporal similares al grupo control, y con una lesión específica del ARC. La lesión produjo un descenso significativo del número total de células del ARC y, particularmente, de las neuronas NPY/AgRP. En estas condiciones, obtuvimos una reducción de aproximadamente el 60% de las inervaciones de las neuronas AgRP al NPV en los animales con el ARC-lesionado, respecto de los animales con el ARC-intacto en condiciones basales. Esta reducción en las inervaciones de AgRP al NPV resultó mayor que los valores previamente informados para las inervaciones de NPY al NPV en animales generados con el mismo protocolo (Cabral et al., 2016). Dichas diferencias podrían deberse a que las fibras productoras de NPY que inervan al NPV no sólo provienen del ARC, sino también del NTS que no resulta afectado por la lesión (Sawchenko et al., 1985). Nuestros resultados indicaron que los animales ayunados con el ARC-lesionado no presentaron un aumento de las inervaciones AgRP al NPV ni tampoco presentaron una activación ni un aumento en la biosíntesis del CRF en este núcleo. Se ha reportado recientemente que los niveles de ghrelina plasmáticas en los animales con el ARC-lesionado durante un ayuno no difieren de los valores cuantificados en animales ayunados con el ARC-intacto (Li et al., 2018), por lo que podemos decir que los resultados obtenidos en nuestros experimentos no se deben a una disminución de los valores de ghrelina plasmáticos como consecuencia de la lesión. En conclusión, nuestros resultados indican que la activación de las neuronas CRF del NPV en una situación de ayuno requiere de la presencia de las neuronas AgRP/NPY del ARC.

En relación a estos resultados es interesante discutir un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio en el cual la administración sistémica de ghrelina es capaz de activar las neuronas CRF del NPV en ausencia del ARC (Cabral et al., 2016). A pesar de que estas observaciones pueden resultar contradictorias, existen diferencias experimentales que pueden explicar dicha discrepancia. En primer lugar, el estudio previo fue realizado en un contexto farmacológico ya que se usó una dosis de ghrelina que genera aumentos transitorios y supra fisiológicos de las concentraciones de la hormona alcanzando

un pico agudo (~17 veces respecto de los animales inyectados con vehículo) inmediatamente después de la administración, que disminuye rápidamente a los niveles basales al cabo de unos minutos. Por consiguiente, esta estrategia experimental imita temporalmente un aumento patológico de la hormona. En un contexto fisiológico, como un ayuno de 48 hs, los aumentos endógenos de la hormona son significativamente menores (~2 veces respecto de los animales alimentados (**Figura 8**)) y ocurren con una cinética mantenida durante la totalidad del ayuno. El análisis combinado de ambos estudios indicaría que aumentos suprafisiológicos de la concentración de la ghrelina en plasma pueden activar las neuronas CRF del NPV en ausencia del ARC actuando directamente a nivel pre-sináptico; sin embargo, en una situación de ayuno de 48 hs, cuando el aumento de la concentración de ghrelina en plasma es menor, la presencia del ARC es necesaria para activar las neuronas CRF del NPV en respuesta al ayuno. Por otro lado, como mostramos en el Capítulo 1, durante un ayuno de 48 hs la expresión de GHSR en el ARC aumentó ~3 veces respecto de un animal alimentado, por lo que sería probable que la lesión del ARC impacte directamente sobre los niveles de GHSR en este núcleo y sobre los niveles de GHSR pre-sinápticos de estas neuronas en el NPV, disminuyendo de esta manera, la activación de las neuronas CRF. Por otro lado, como pudimos observar en este trabajo, durante el ayuno ocurren readaptaciones en los circuitos neuronales hipotalámicos que facilitan la integración del ARC con el NPV modificando su capacidad de respuesta. De esta manera, el ARC pasaría a cumplir un rol fundamental durante el ayuno que posiblemente no pudo ser puesto de manifiesto cuando se estudió el efecto de la ghrelina en una condición de alimentación *ad libitum*.

Posteriormente, estudiamos si el aumento de las inervaciones NPY/AgRP al NPV depende de la señalización del sistema ghrelina/GHSR. Para llevar a cabo este estudio, nuevamente recurrimos al uso de dos herramientas complementarias: los animales GHSR(-/-) y animales WT tratados con K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ durante el período de ayuno. En los animales GHSR(-/-) ayunados, las aferencias de las neuronas NPY/AgRP hacia el NPV no aumentaron con respecto a los animales GHSR(-/-) alimentados *ad libitum*. Esto se correlaciona con la disminución en la biosíntesis peptídica de ambos neuropéptidos en el ARC descriptos en el Capítulo 1. De esta manera, podríamos sugerir que las adaptaciones en las inervaciones del ARC al NPV inducidas por ayuno dependen de la señalización del sistema ghrelina/GHSR. Es indispensable señalar, que en los animales GHSR(-/-) detectamos un aumento basal de las inervaciones NPY/AgRP del ARC al NPV cuando utilizamos tanto herramientas IHQs como cuando usamos ratones GHSR(-/-)/NPY-GFP. Estos resultados no son inesperados debido a que la ghrelina participa en los estadios tempranos del neuro-desarrollo estableciendo las proyecciones hipotalámicas que conectan el ARC con el NPV (Bouret et al., 2004). En este sentido, el bloqueo de la señalización de la ghrelina en estadios tempranos genera un abrupto incremento de la densidad de proyecciones del ARC al NPV (Steculorum et al., 2015), lo cual explicaría porque los animales GHSR(-/-) presentan aumentos basales de las proyecciones de las neuronas NPY/AgRP al NPV. Por otro lado, como describimos previamente, la eliminación genética de los genes que codifican para la ghrelina o para GHSR produce solo pequeñas alteraciones en el fenotipo de estos ratones, lo cual sugiere que la ausencia de la transcripción de estos genes durante la vida temprana, puede causar mecanismos compensatorios en el desarrollo que repercuten en estadios más tardíos de vida (Sun et al., 2003, Sun et al., 2004, Wortley et al., 2004, Zigman et al., 2005).

En los ratones GHSR(-/-) no se observó un aumento en las inervaciones NPY/AgRP del ARC al NPV ni un aumento en la biosíntesis y activación de las neuronas CRF con el ayuno. El hecho de que los ratones GHSR(-/-) presentaran menores niveles plasmáticos de corticosterona y glucosa respecto de sus hermanos WT en las mismas condiciones experimentales, nos permite confirmar que la señalización del sistema ghrelina/GHSR cumple un rol esencial en los mecanismos responsables de la activación de las neuronas CRF y el eje HHA contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Estudios previos han mostrado que la expresión de GHSR exclusivamente en las neuronas AgRP del ARC es suficiente para restaurar completamente el bajo nivel de glucosa plasmática observada luego de una restricción calórica (Wang et al., 2014). De esta manera, nuestros estudios indican que la presencia de GHSR es necesaria para mediar el aumento de la biosíntesis de NPY/AgRP en el ARC y aumentar las proyecciones de estas neuronas hacia el NPV, mecanismos que parecen ser indispensables en la activación de las neuronas CRF y el eje HHA. Ya ha sido reportado que los ratones GHSR(-/-) ayunados presentan menores niveles de glucosa en sangre como consecuencia de una deficiencia de GH (Sun et al., 2004, Zigman et al., 2005). La menor activación del eje HHA en estos ratones durante el ayuno también contribuiría a que se genere un menor nivel de glucocorticoides en plasma que, en conjunto, resultan en hipoglucemias más severas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevas herramientas para el entendimiento de los mecanismos neuronales por los cuales el sistema ghrelina/GHSR interviene en la activación de las neuronas CRF y el eje HHA involucrado en la regulación de la homeostasis de la glucemia.

Dado que los ratones GHSR(-/-) muestran adaptaciones hipotalámicas propias del modelo genético en condiciones basales que limitan algunas de nuestras interpretaciones, resultaría inapropiado aseverar que la ausencia de la activación y del aumento de la biosíntesis de CRF hipotalámico en respuesta al ayuno se debió a la ausencia de la señalización del sistema ghrelina/GHSR o a la inhabilidad del sistema para sobre-regularse sobre los niveles basales. Por este motivo, complementamos nuestros estudios con una herramienta farmacológica utilizando un modulador de la señalización de GHSR en animales WT ayunados. Las administraciones centrales de K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ durante la totalidad del período de ayuno no sólo disminuyeron la hiperfagia compensatoria en estos animales, sino que también disminuyeron la biosíntesis de NPY/AgRP y la activación neuronal del ARC en estas condiciones. Así, utilizamos el mismo protocolo descrito detalladamente en el Capítulo 1 para evaluar las aferencias de las neuronas AgRP desde el ARC al NPV. Utilizando dicha estrategia también observamos una disminución de las aferencias de las neuronas AgRP del ARC al NPV y una menor activación y biosíntesis de CRF. Por lo tanto, confirmamos que la señalización del sistema ghrelina/GHSR sería totalmente necesaria para la activación de las neuronas CRF y el eje HHA en una situación de ayuno severo. En este punto, resulta importante mencionar que el péptido K-(D-1-Nal)-FwLL-NH₂ tiene propiedades de agonista inverso y de antagonista por lo que no podemos confirmar si su efecto inhibitorio sobre la activación del eje HHA se debe al bloqueo de la actividad evocada por ghrelina o de la actividad constitutiva de GHSR. Otro punto a tener en cuenta, es que desconocemos si la accesibilidad de la ghrelina al NPV cambia en situaciones de ayuno. Investigaciones recientes han postulado que el estado nutricional puede regular la permeabilidad de los órganos circunventriculares y de esta manera modular el acceso de las hormonas al cerebro (Langlet et al., 2013, Prevot et al., 2013). Por otro lado, ha sido mostrado que administraciones suprafisiológicas

periféricas de ghrelina son capaces de alcanzar al NPV en animales alimentados (Cabral et al., 2015); sin embargo, queda por determinar en un futuro si la ghrelina es capaz de acceder a zonas más profundas del cerebro en una condición de ayuno. De esta manera, nuestros resultados no nos permiten discriminar si para la activación de las neuronas CRF del NPV en respuesta a un ayuno de 48 hs es necesaria la actividad evocada de ghrelina o la actividad constitutiva en el ARC y/o a nivel pre-sináptico en el NPV. En este punto es importante mencionar que aún no hemos podido determinar si los niveles de GHSR en el NPV también aumentan con un ayuno de 48 hs.

Por todo lo anteriormente discutido, este trabajo de Tesis Doctoral nos permitió mostrar que la señalización del sistema ghrelina/GHSR es necesaria sólo parcialmente para desarrollar las respuestas orexigénicas adaptativas en respuesta a un ayuno severo. Este hecho lo pudimos poner de manifiesto usando tanto modelos genéticos con ratones GHSR(-/-) y ratones ghrelina-KO, como con diferentes estrategias farmacológicas para modular la actividad de GHSR. En todos los casos, el bloqueo de la señalización de GHSR reduce la hiperfagia compensatoria posterior al ayuno alrededor de un 15%. Esto indica que la señalización del sistema ghrelina/GHSR es uno de los varios factores más que contribuye en el control de los mecanismos responsables de la alimentación en situaciones de balance energético negativo. Por el contrario, la señalización del sistema ghrelina/GHSR parece ser fundamental en el control del eje neuroendocrino HHA encargado principalmente de la regulación de la homeostasis de la glucemia. Esto pudimos evaluarlo mediante el uso de los ratones GHSR(-/-), ratones con el ARC-lesionado y mediante estrategias farmacológicas. En todos los casos, el sistema ghrelina/GHSR fue necesario para aumentar las proyecciones del ARC al NPV y activar las neuronas CRF y el eje HHA. Por este motivo, se puede considerar que ante desafíos homeostáticos severos, la señalización del sistema ghrelina/GHSR ejerce una función protectora que previene la hipoglucemia promoviendo, de esta manera, la supervivencia.

Capítulo 3: Estudio del rol modulador de la DAG sobre el sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico

Hasta aquí, hemos mostrado que la señalización del sistema ghrelina/GHSR es importante para modular los eventos hiperfágicos y fundamental para modular la respuesta de las neuronas CRF y el eje HHA ante un evento de ayuno. Ante una situación de déficit energético severo no solo aumentó la expresión de GHSR, sino que también aumentaron los niveles de ghrelina y de DAG en plasma. Debido a que, a la fecha, no se ha publicado la existencia de un receptor específico para DAG y, en consecuencia, continúa siendo un tema de debate si este péptido puede considerarse como una hormona en sí o un mero producto de degradación de la ghrelina, nos propusimos aportar información sobre este tema estudiando detalladamente los sitios de acción de la DAG en el cerebro, y enfocándonos particularmente en las consecuencias funcionales de su acción en el ARC y su relación con el sistema ghrelina/GHSR a nivel hipotalámico.

En el desarrollo de este trabajo mostramos evidencias sólidas de que la DAG se une directamente a neuronas del ARC. Para llevar a cabo este estudio, utilizamos un análogo de la DAG de 19 aminoácidos correspondiente a la parte N-terminal de la cadena de DAG conjugada a una molécula de fluoresceína en

el extremo C-terminal. La marca fluorescente observada por la unión de F-DAG en el ARC se redujo cuando agregamos un exceso de DAG no marcada, sugiriendo que la unión del trazador fue específica, y representando una herramienta eficaz para detectar los sitios de unión de DAG en el cerebro. Asimismo, la F-DAG aumentó los niveles de c-Fos en el ARC y bloqueó el efecto orexigénico de la ghrelina administrada por vía subcutánea de la misma manera que lo hizo la DAG, indicando, además, que este péptido trazador F-DAG es completamente bioactivo. Está bien descrito en la literatura que para que la ghrelina pueda unirse y activar a GHSR necesita de los primeros 4-5 aminoácidos N-terminales y el grupo octanoilo (Bednarek et al., 2000). De forma similar, parecería que la región de unión de la DAG a su receptor, aún desconocido, también se ubicaría dentro de los primeros aminoácidos N-terminales debido a que la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal del trazador no difiere de la secuencia de la DAG intacta (Hosoda et al., 2000). En base a esto, era esperable que la especificidad por el receptor se encuentre en esta zona debido a que es la única región en la que la DAG difiere de la ghrelina por la presencia o ausencia del grupo octanoilo.

Posteriormente, caracterizamos fenotípicamente las poblaciones neuronales donde se une la DAG, dentro de las cuales pudimos detectar una sub-población de neuronas NPY del ARC y un tipo celular endocrino denominado tanicito. Ambos tipos celulares se encuentran localizados en estrecha cercanía a la EM, siendo fácilmente alcanzados por la DAG en circulación. Dado que las neuronas NPY/AgRP cumplen un rol fundamental en la regulación del apetito, podrían ser las mediadoras de los efectos de la F-DAG encontrados sobre el consumo de alimento (Gropp et al., 2005, Luquet et al., 2005). La mayoría de las neuronas NPY/AgRP del ARC expresan GHSR (Willesen et al., 1999), y sólo en la parte medial de este núcleo hay co-expresión de GHSR y receptores de leptina (Perello et al., 2012), indicando una elevada especialización de estas neuronas en la integración de las señales periféricas que regulan el balance energético. Curiosamente, observamos que la F-DAG también se unió a células que no fueron NPY+ ni POMC+, lo que nos indicaría que este péptido podría estar impactando adicionalmente en otro tipo neuronal dentro del ARC, que continúa sin conocerse hasta el momento.

En esta caracterización fenotípica de los sitios hipotalámicos donde se une F-DAG, también se encontró marca en los tanicitos que recubren el suelo del tercer ventrículo. Los tanicitos hipotalámicos son células endocriales bipolares especializadas que conectan el líquido cefalorraquídeo (LCR) con los capilares fenestrados de la EM, por lo que la observación de co-localización con la F-DAG supondría que serían capaces de transportar DAG a través de la barrera sangre-LCR. En apoyo a esta posibilidad, estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado que la F-ghrelina también se detecta en los tanicitos de los animales inyectados centralmente con este marcador (Cabral et al., 2013, Cabral et al., 2014). Se ha reportado que los tanicitos hipotalámicos ubicados en la EM también incorporan leptina circulante a través de un receptor específico transportándola directamente al líquido cefalorraquídeo (Balland et al., 2014). Estudios más recientes han mostrado que los tanicitos hipotalámicos también internalizan la ghrelina o F-ghrelina administradas sistémicamente en ratones, encontrándose un consecuente aumento en el nivel de ghrelina presente en el LCR luego de estas administraciones (Uriarte et al., 2018). De acuerdo a estos resultados, y sumado al hecho de que la DAG accede rápidamente al cerebro (Banks et al., 2002), los tanicitos hipotalámicos podrían estar cumpliendo un rol relevante en éste transporte a través de la barrera sangre-LCR. Cabe destacar que también encontramos células marcadas

débilmente con F-DAG en otras áreas del cerebro de los ratones administrados con este péptido; sin embargo, esta marca fue menos intensa en comparación con la marca descrita en el ARC. Por este motivo, resulta necesario enfatizar que el número, la ubicación y la señal fluorescente de las células marcadas con F-DAG encontradas en este estudio, dependieron de la accesibilidad al parénquima cerebral de este trazador inyectado por vía central. A pesar de que la vía de administración nos brindó herramientas robustas para visualizar los sitios de unión directos para DAG, nos limitó en la detección de otros sitios de unión alejados de la zona ventricular en el cerebro del ratón.

Como mencionamos anteriormente, debido a que la F-DAG se une a una sub-población de neuronas NPY/AgRP del ARC que se caracterizan por expresar altos niveles de GHSR, estudiamos si la unión y el efecto de la DAG dependen de este receptor. De manera interesante, encontramos células que unen F-DAG en el cerebro de ratones GHSR(-/-) indicando que la presencia de GHSR no es requerida para la unión de DAG. En base a esto, existen trabajos previos que también sugieren que las acciones de la DAG son independientes de GHSR. Por ejemplo, el tratamiento central con DAG regula la temperatura corporal en presencia de antagonistas de GHSR (Inoue et al., 2013); además, la DAG se encuentra involucrada en la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos en ratones GHSR(-/-) (Delhanty et al., 2010). Asimismo, varios estudios de unión en diferentes tipos celulares sugieren la existencia de un receptor específico para la DAG diferente de GHSR (Sato et al., 2006, Lear et al., 2010, Togliatto et al., 2010). Sin embargo, y tal como mencionamos anteriormente en la Discusión, no se puede descartar que los animales GHSR(-/-) utilizados en este trabajo presenten un mínimo nivel de expresión de GHSR que permita la unión de F-DAG. De todas maneras, la probabilidad de que esto ocurra es extremadamente baja debido a que los animales GHSR(-/-) tratados con DAG mostraron un aumento significativo en el número de células c-Fos+ en el ARC que no difirió de las cuantificaciones realizadas en animales WT bajo el mismo tratamiento. Por consiguiente, según nuestra revisión bibliográfica, los estudios llevados a cabo en este trabajo son los primeros que muestran que la DAG se une específicamente a neuronas hipotálamicas a través de un receptor desconocido pero diferente de GHSR.

Consistentemente con su acción sobre neuronas del ARC, y debido a las inconsistencias encontradas en la literatura sobre los efectos de la DAG sobre la ingesta de alimentos (Asakawa et al., 2005, Chen et al., 2005, Inhoff et al., 2008), en este trabajo estudiamos el rol de la DAG en situaciones de alto consumo de alimento espontáneo, como lo son la fase nocturna del ciclo luz/oscuridad y durante la realimentación luego de un periodo de ayuno. En nuestras condiciones experimentales, no logramos detectar ningún efecto significativo de la DAG administrada centralmente sobre el consumo de alimento en ninguno de los protocolos experimentales utilizados. Estos resultados no fueron completamente inesperados debido a que otros estudios tampoco han podido detectar efectos inhibitorios de la DAG sobre la ingesta de alimentos en animales alimentados *ad libitum* o realimentados luego de un ayuno (Matsuda et al., 2006, Neary et al., 2006, Toshinai et al., 2006). Por otro lado, debemos destacar que nuestras observaciones no parecen depender de la dosis utilizada, debido a que otros estudios tampoco han detectado ningún efecto sobre este parámetro usando un rango más amplio de dosis (Heppner et al., 2014). En este trabajo, utilizamos la vía de administración central de la DAG para evitar cualquier potencial contribución de las acciones periféricas del péptido en nuestras observaciones, y para descartar, adicionalmente, la falta de efecto debido a una posible dificultad en la accesibilidad de este péptido al

cerebro. Por lo tanto, la razón de las inconsistencias encontradas entre nuestros resultados y algunos trabajos previos (Asakawa et al., 2005, Chen et al., 2005) no queda clara; sin embargo, el hecho de no haber observado una disminución de la ingesta de alimentos en la fase nocturna ni en el periodo de realimentación posterior al ayuno, nos permiten descartar cualquier efecto de la DAG sobre la señalización constitutiva de GHSR.

Dado que el efecto orexigénico en respuesta a la administración de la ghrelina es mediado por las neuronas NPY/AgRP del ARC (Nakazato et al., 2001, Chen et al., 2004, Cabral et al., 2014, Wang et al., 2014), posteriormente evaluamos la posible interacción de la DAG y la administración de ghrelina sobre la ingesta de alimento. A diferencia de los resultados previamente obtenidos con el consumo de alimento espontáneo, en este caso, encontramos que la misma dosis utilizada anteriormente de DAG administrada ICV afectó la ingesta de alimentos inducida por la ghrelina administrada periféricamente, resultados que confirman los datos previamente publicados (Inhoff et al., 2008). Sin embargo, no detectamos ningún efecto sobre las acciones de ghrelina administrada de forma central. Posiblemente este resultado sea consecuencia de las diferentes dosis de ghrelina utilizadas en estos estudios. Estas dosis fueron previamente caracterizadas en nuestro laboratorio, mostrando que la dosis utilizada en las administraciones periféricas es suficiente para aumentar la ingesta de alimentos alcanzando y activando exclusivamente al ARC y la EM (Cabral et al., 2014, Cabral et al., 2015). En cambio, la dosis utilizada en las administraciones centrales, además de generar aumentos mayores del consumo de alimento, también es capaz de acceder y activar a una gran variedad de núcleos cerebrales que pueden mediar los efectos orexigénicos de la hormona incluso en ausencia del ARC (Nakazato et al., 2001, Lawrence et al., 2002, Cabral et al., 2013, Cabral et al., 2014, Cabral et al., 2015). Por todo lo anteriormente expuesto, los resultados obtenidos en base al estudio comportamental del consumo de alimento junto con los datos neuroanatómicos previamente mostrados, podemos concluir que la DAG es capaz de bloquear las acciones orexigénicas de la ghrelina inyectada por vía subcutánea a través de su acción sobre neuronas del ARC, pero no sobre otros sitios blanco de ghrelina en el cerebro.

Las implicancias fisiológicas del efecto de la DAG sobre las acciones de ghrelina a nivel hipotalámico continúan siendo inciertas. Algunos estudios han sugerido que la ghrelina y la DAG podrían ser producidas centralmente (Sato et al., 2005); sin embargo, la fuente principal de estos péptidos en el hipotálamo parece ser a través del acceso desde la circulación (Furness et al., 2011, Cabral et al., 2015, Perello et al., 2018, Uriarte et al., 2018). Los niveles plasmáticos de ambos péptidos incrementan al mismo tiempo, es decir, antes de los períodos de alto consumo de alimento como lo son al comienzo y al final de la fase oscura del ciclo de luz/oscuridad de los roedores (Murakami et al., 2002) o durante condiciones de ayuno como mostramos en este trabajo. Consideramos que al igual que para el sistema ghrelina/GHSR, los efectos biológicos de la DAG podrían intentar desenmascarse en condiciones donde sus niveles se encuentren elevados. De hecho, la ausencia de efecto de la DAG sobre la ingesta nocturna o sobre la hiperfagia compensatoria en respuesta al ayuno que observamos en nuestros experimentos, quizá se deba a que en ambas condiciones las concentraciones de la DAG endógena ya se encontraban elevadas y que, por ende, la DAG administrada no fuera capaz de generar un efecto adicional. No obstante, la ausencia de efecto de la DAG en la ingesta post-ayuno concuerda con el hecho de que dicha hiperfagia compensatoria posterior a un ayuno dependería en mayor medida de la actividad constitutiva de GHSR y no de la ghrelina en sí,

explicando de esta manera la falta de un efecto en este protocolo. Por otro lado, a pesar de que la DAG y la ghrelina se secretan juntas en el estómago, la DAG también se produce rápidamente por la desacilación de la ghrelina en la circulación (Akamizu et al., 2004, De Vriese et al., 2004). Por lo tanto, el mecanismo de desacilación de la ghrelina en plasma podría funcionar como un mecanismo modulador de la actividad de esta hormona debido a que no solo disminuye su concentración plasmática sino que también limita sus acciones biológicas a través de la producción de DAG. Este rol anorexigénico de la DAG es consistente con el fenotipo de los ratones transgénicos que sobre-expresan el gen de ghrelina en tipos celulares que carecen de la expresión de GOAT. Estos ratones transgénicos muestran un elevado nivel de DAG en plasma, en vez de ghrelina, como así también muestran una reducción en la ingesta de alimentos, el peso corporal, la masa grasa y la longitud corporal (Uchida et al., 2013).

Con la finalidad de obtener información adicional sobre el posible mecanismo por el cual la DAG interactúa con la ghrelina disminuyendo su efecto orexigénico realizamos un análisis de distribución topográfica de las células c-Fos+ en las distintas subregiones del ARC. Confirmamos en este trabajo que tanto la ghrelina como la DAG, incrementan el número de células c-Fos+ en el ARC como ya había sido reportado previamente (Asakawa et al., 2005, Cabral et al., 2014). Sin embargo, el efecto de la DAG y la ghrelina podrían estar desencadenándose sobre diferentes poblaciones neuronales del ARC, lo cual impactaría de manera diferencial sobre la ingesta de alimentos. Las neuronas marcadas con F-DAG y la inducción de c-Fos en respuesta a DAG ocurrió principalmente en el ARCvm, en el mismo sitio donde se encuentran localizadas principalmente las neuronas NPY/AgRP (Elias et al., 1998). Incluso, como describimos anteriormente, una sub-población de estas neuronas se marcaron con F-DAG. Por este motivo, la DAG podría impactar directamente sobre esta sub-población de neuronas que, a su vez, es un sitio clave de la ghrelina en el ARC (Wang et al., 2002). Debido a que las neuronas NPY no pueden visualizarse fácilmente utilizando una IHQ convencional en ratones salvajes sin un tratamiento previo con colchicina, no fue posible en este trabajo estudiar la activación neuronal por DAG sobre estas células. Sin embargo, queda a la fecha, realizar estos experimentos utilizando el modelo de ratón transgénico NPY-GFP disponible en nuestro laboratorio. De todas maneras, no sería posible confirmar una acción directa de DAG sobre las neuronas NPY/AgRP del ARC basándonos solamente en la observación de un aumento en los niveles de c-Fos en estas neuronas, debido a que la expresión de este marcador también se puede dar en células activadas indirectamente por los circuitos neuronales que regula y no siempre se encuentra asociado con un aumento de la actividad neuronal (Hoffman and Lyo, 2002). De hecho, la DAG podría estar interviniendo en las vías de señalización de la ghrelina a niveles moleculares corriente abajo de c-Fos, como resultado de la elevada complejidad de los mecanismos de señalización intracelulares regulados por GHSR (Lopez Soto et al., 2015). Otra alternativa sería que la inhibición del efecto orexigénico de la ghrelina desencadenada por la DAG sea ocasionada por el efecto sobre una población diferente de neuronas anorexigénicas presentes en el ARCvm. Esta posibilidad se sustenta con el hecho de que la F-DAG también marcó un grupo de células en el ARC no identificadas hasta el momento y por la observación de que el tratamiento ICV con DAG y ghrelina periférica mostró un efecto aditivo sobre la inducción de c-Fos en el ARCvm. En base a todo lo expuesto, consideramos que se necesitarán mayores estudios que revelen una posible co-localización del receptor de DAG con GHSR en el ARC para poder discriminar entre estas dos posibilidades.

La inducción de c-Fos ya había sido utilizada previamente para identificar los sitios neuronales blanco de la DAG. Dos estudios independientes han mostrado que la DAG aumenta el número de células c-Fos⁺ en las neuronas POMC y Nesfastina-1 del ARC (Inhoff et al., 2008, Stevanovic et al., 2014). Ambos tipos celulares podrían ser la misma población debido a que ambos neuropéptidos se co-producen en neuronas del ARC (Brailoiu et al., 2007). En este trabajo pudimos confirmar que la DAG activa las neuronas POMC del ARC a pesar de no unirse directamente a ellas. Además, tanto la ghrelina como la DAG activan estas neuronas con un porcentaje similar; siendo la DAG más selectiva respecto a la activación de las neuronas POMC, al menos en función del porcentaje de neuronas POMC⁺ en comparación con el total de neuronas activadas. Por consiguiente, podríamos especular que la DAG activaría preferentemente a las neuronas anorexigénicas dentro del ARC de manera indirecta, debido a que estas neuronas no fueron marcadas con F-DAG inyectada ICV. Si bien nuestros datos respaldan la posibilidad de que la DAG y la ghrelina tengan un impacto diferencial a nivel de ARC, resulta interesante resaltar la observación de que los tanicitos hipotalámicos muestren una captación significativa de la F-DAG. En relación a estos resultados, otra explicación alternativa sería que la DAG administrada ICV pueda inhibir el efecto orexigénico de la ghrelina administrada por vía subcutánea reduciendo el transporte de esta hormona periférica al hipotálamo. Estudios recientes respaldan esta posibilidad mostrando que la administración ICV de un péptido que presenta los mismos aminoácidos que ghrelina en un orden diferente y que no es bioactivo, bloquea parcialmente el efecto orexigénico de la ghrelina administrada periféricamente (Uriarte et al., 2018). En resumen, esta última parte de este trabajo de Tesis Doctoral aporta evidencias directas de que existen sitios de unión específicos para la DAG en el hipotálamo de un ratón adulto y que la localización del receptor aún desconocido en neuronas del ARC concuerda con el rol potencial de DAG en la regulación de la ingesta de alimentos.

Por otro lado, en el marco de esta Tesis Doctoral no pudimos profundizar el estudio de los efectos de la DAG sobre el eje HHA a pesar de la observación de que la DAG también activa al NPV cuando es administrada ICV. Por ello, y debido a que la DAG también regula algunas poblaciones del ARC, podríamos inferir que la activación de las neuronas del NPV ocurriría de manera indirecta y en dependencia del ARC debido a que es el único núcleo cerebral en el que observamos la mayor unión de este péptido. Futuras investigaciones serán necesarias para establecer la relevancia fisiológica y los posibles mecanismos neuronales por los cuales la DAG interviene en estos circuitos.

Creemos que los aportes que realizamos en este área son de extrema importancia para aplicaciones clínicas en un futuro cercano. Recientemente, se ha desarrollado un compuesto denominado AZP-531, el primer análogo de la DAG que ya ha sido probado en roedores mostrando una inhibición del efecto orexigénico de la ghrelina, una mejora en el control de la glucemia y una disminución del peso corporal (Allas et al., 2018). En la actualidad este compuesto se encuentra en ensayo clínico fase 2b/3 para evaluar su seguridad, tolerabilidad y eficacia para su uso a largo plazo en pacientes con Síndrome de Prader-Willi (ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Febrero 2019. Identificador: NCT03790865. Effects of Livoletide (AZP-531) on Food-related Behaviors in Patients With Prader-Willi Syndrome. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03790865>).

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral nos permiten concluir que:

1. El sistema ghrelina/GHSR es parcialmente necesario para el desarrollo un evento hiperfágico completo luego de un ayuno de 48 hs. Dicho rol del sistema ghrelina/GHSR durante el ayuno involucraría a las neuronas NPY/AgRP del ARC y sería independiente de la ghrelina plasmática.
2. El sistema ghrelina/GHSR es totalmente necesario para que ocurra la activación de las neuronas CRF del NPV y eje HHA durante un ayuno de 48 hs. Dicho rol del sistema ghrelina/GHSR durante el ayuno implicaría un aumento en la cantidad de proyecciones de las neuronas NPY/AgRP desde el ARC hacia el NPV, las cuales serían necesarias para la activación de las neuronas CRF.
3. La DAG actúa directamente sobre una sub-población de neuronas NPY/AgRP del ARC de manera independiente a GHSR. En algunas condiciones experimentales, la DAG inhibe las acciones orexigénicas de la ghrelina.

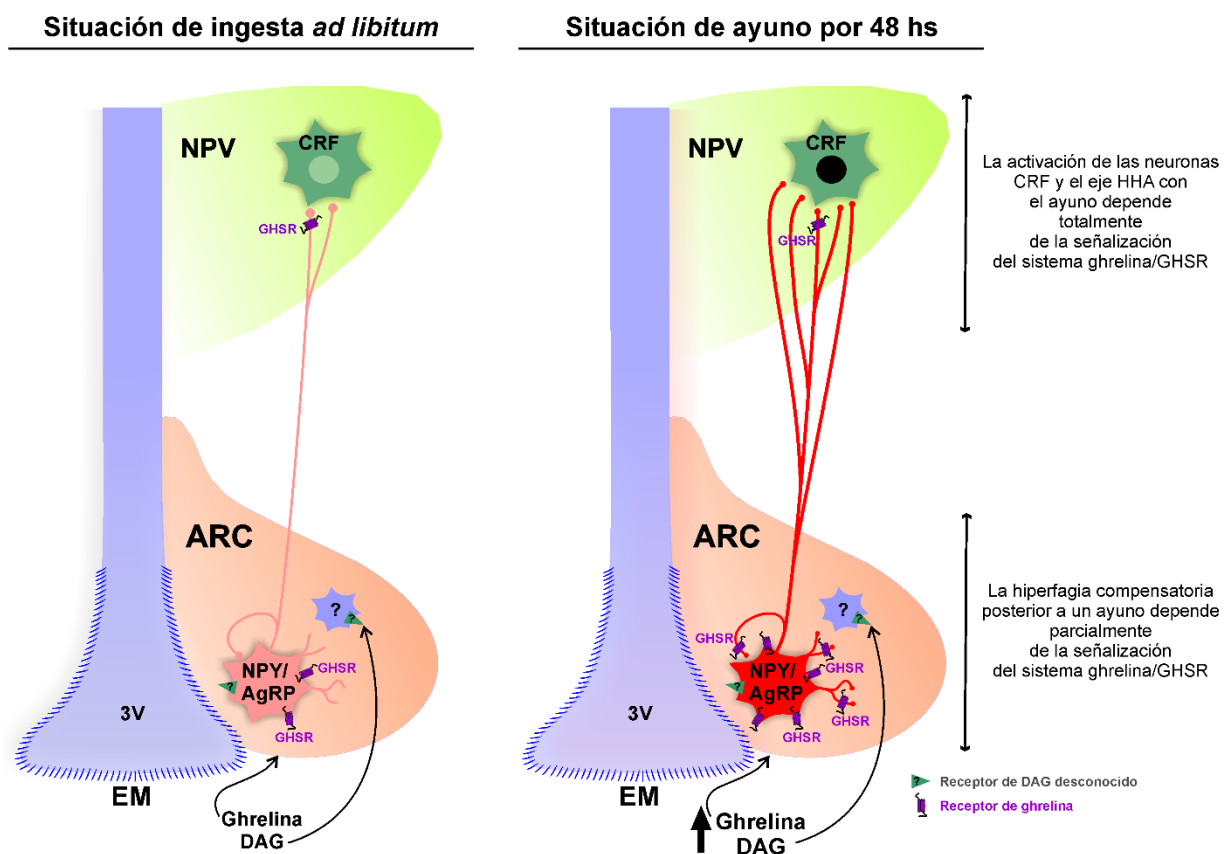


Figura 43: Esquema del hipotálamo de un ratón donde se muestran los potenciales mecanismos por el cual el sistema ghrelina/GHSR modula la hiperfagia compensatoria posterior a un ayuno y por el cual activaría a las neuronas CRF del NPV en ratones alimentados (izquierda) y en ratones ayunados por 48 hs (derecha). Las abreviaturas indican: ARC: núcleo Arcuato, NPV: núcleo paraventricular, EM: eminencia media, CRF: factor liberador de corticotropina, GHSR: receptor de ghrelina, DAG: desacil-ghrelina; NPY: neuropéptido Y, 3V: tercer ventrículo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abegg K, Bernasconi L, Hutter M, Whiting L, Pietra C, Giuliano C, Lutz TA, Riediger T (2017) Ghrelin receptor inverse agonists as a novel therapeutic approach against obesity-related metabolic disease. *Diabetes, obesity & metabolism* 19:1740-1750.
- Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical record* 94:239-247.
- Adan RA, van Dijk G (2006) Melanocortin receptors as drug targets for disorders of energy balance. *CNS & neurological disorders drug targets* 5:251-261.
- Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, Kangawa K (2005) Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:6-9.
- Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K (2004) Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 150:447-455.
- Allas S, Caixas A, Poitou C, Coupaye M, Thuilleaux D, Lorenzini F, Diene G, Crino A, Illouz F, Grugni G, Potvin D, Bocchini S, Delale T, Abribat T, Tauber M (2018) AZP-531, an unacylated ghrelin analog, improves food-related behavior in patients with Prader-Willi syndrome: A randomized placebo-controlled trial. *PLoS one* 13:e0190849.
- Andrews ZB (2011) Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. *Peptides* 32:2248-2255.
- Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience* 14:351-355.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:4753-4758.
- Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E (2001) Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:1169-1174.
- Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M (2005) Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 54:18-24.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M (2003) Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52:947-952.
- Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM (2012) Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488:172-177.
- Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prevot V (2014) Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism* 19:293-301.
- Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML (2002) Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302:822-827.
- Barraco IRA (1994) Nucleus of the solitary tract. Boca Raton: CRC Press.
- Bartanusz V, Muller D, Gaillard RC, Streit P, Vutskits L, Kiss JZ (2004) Local gamma-aminobutyric acid and glutamate circuit control of hypophyseotrophic corticotropin-releasing factor neuron activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *The European journal of neuroscience* 19:777-782.
- Becskei C, Bilik KU, Klusmann S, Jarosch F, Lutz TA, Riediger T (2008a) The anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11-3 blocks ghrelin- but not fasting-induced neuronal activation in the hypothalamic arcuate nucleus. *Journal of neuroendocrinology* 20:85-92.

- Becksei C, Lutz TA, Riediger T (2008b) Glucose reverses fasting-induced activation in the arcuate nucleus of mice. *Neuroreport* 19:105-109.
- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV (2000) Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Journal of medicinal chemistry* 43:4370-4376.
- Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM (2013) Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* 155:1337-1350.
- Biag J, Huang Y, Gou L, Hintiryan H, Askarinam A, Hahn JD, Toga AW, Dong HW (2012) Cyto- and chemoarchitecture of the hypothalamic paraventricular nucleus in the C57BL/6J male mouse: a study of immunostaining and multiple fluorescent tract tracing. *The Journal of comparative neurology* 520:6-33.
- Blauwhoff-Buskermolen S, Langius JA, Heijboer AC, Becker A, de van der Schueren MA, Verheul HM (2017) Plasma Ghrelin Levels Are Associated with Anorexia but Not Cachexia in Patients with NSCLC. *Frontiers in physiology* 8:119.
- Boudaba C, Schrader LA, Tasker JG (1997) Physiological evidence for local excitatory synaptic circuits in the rat hypothalamus. *Journal of neurophysiology* 77:3396-3400.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:2797-2805.
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ (2007) Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 148:5088-5094.
- Broberger C (2005) Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *Journal of internal medicine* 258:301-327.
- Bumaschny VF, Yamashita M, Casas-Cordero R, Otero-Corchon V, de Souza FS, Rubinstein M, Low MJ (2012) Obesity-programmed mice are rescued by early genetic intervention. *The Journal of clinical investigation* 122:4203-4212.
- Butler AA, Girardet C, Mavrikaki M, Trevaskis JL, Macarthur H, Marks DL, Farr SA (2017) A Life without Hunger: The Ups (and Downs) to Modulating Melanocortin-3 Receptor Signaling. *Frontiers in neuroscience* 11:128.
- Cabral A, Cornejo MP, Fernandez G, De Francesco PN, Garcia-Romero G, Uriarte M, Zigman JM, Portiansky E, Reynaldo M, Perello M (2017a) Circulating Ghrelin Acts on GABA Neurons of the Area Postrema and Mediates Gastric Emptying in Male Mice. *Endocrinology* 158:1436-1449.
- Cabral A, De Francesco PN, Perello M (2015) Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: narrow gates for a vast kingdom. *Frontiers in endocrinology* 6:44.
- Cabral A, Fernandez G, Perello M (2013) Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience* 253:406-415.
- Cabral A, Lopez Soto EJ, Epelbaum J, Perello M (2017b) Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *International journal of molecular sciences* 18.
- Cabral A, Portiansky E, Sanchez-Jaramillo E, Zigman JM, Perello M (2016) Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrinology* 67:27-39.
- Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PloS one* 7:e31462.
- Cabral A, Valdivia S, Fernandez G, Reynaldo M, Perello M (2014) Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *Journal of neuroendocrinology* 26:542-554.
- Cahill GF, Jr. (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annual review of nutrition* 26:1-22.
- Cameron KO, Bhattacharya SK, Loomis AK (2014) Small molecule ghrelin receptor inverse agonists and antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 57:8671-8691.

- Camina JP, Lodeiro M, Ischenko O, Martini AC, Casanueva FF (2007) Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: role of G-proteins and beta-arrestins. *Journal of cellular physiology* 213:187-200.
- Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, Pers TH, Lyubetskaya A, Tenen D, Goldman M, Verstegen AM, Resch JM, McCarroll SA, Rosen ED, Lowell BB, Tsai LT (2017) A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nature neuroscience* 20:484-496.
- Castellini G, Castellani W, Lelli L, Sauro CL, Dini C, Lazzeretti L, Bencini L, Mannucci E, Ricca V (2014) Association between resting energy expenditure, psychopathology and HPA-axis in eating disorders. *World journal of clinical cases* 2:257-264.
- Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hokfelt T (1989) Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:9569-9573.
- Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prevot V, Levine JE (2009) Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150:5509-5519.
- Cortes R, Navarro S, Agulleiro MJ, Guillot R, Garcia-Herranz V, Sanchez E, Cerda-Reverter JM (2014) Evolution of the melanocortin system. *General and comparative endocrinology* 209:3-10.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nilni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-661.
- Cullinan WE (2000) GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. *The Journal of comparative neurology* 419:344-351.
- Cummings DE (2006) Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & behavior* 89:71-84.
- Cyr NE, Toorie AM, Steger JS, Sochat MM, Hyner S, Perello M, Stuart R, Nilni EA (2013) Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic alpha-MSH and TRH. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 304:E640-650.
- Chen C-Y, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen C-C, Ueno N, Fujimiya M (2005) Des-acyl Ghrelin Acts by CRF Type 2 Receptors to Disrupt Fasted Stomach Motility in Conscious Rats. *Gastroenterology* 129:8-25.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145:2607-2612.
- Chen VP, Gao Y, Geng L, Brimijoin S (2017) Butyrylcholinesterase gene transfer in obese mice prevents postdieting body weight rebound by suppressing ghrelin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:10960-10965.
- Chuang JC, Perello M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Savitt JM, Lutter M, Zigman JM (2011) Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice. *The Journal of clinical investigation* 121:2684-2692.
- Damian M, Marie J, Leyris JP, Fehrentz JA, Verdie P, Martinez J, Baneres JL, Mary S (2012) High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *The Journal of biological chemistry* 287:3630-3641.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261.

- De Francesco PN, Valdivia S, Cabral A, Reynaldo M, Raingo J, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Zigman JM, Perello M (2015) Neuroanatomical and functional characterization of CRF neurons of the amygdala using a novel transgenic mouse model. *Neuroscience* 289:153-165.
- De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C (2004) Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 145:4997-5005.
- De Vriese C, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C (2007) Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* 148:2355-2362.
- Delhanty PJ, Sun Y, Visser JA, van Kerkwijk A, Huisman M, van Ijcken WF, Swagemakers S, Smith RG, Themmen AP, van der Lely AJ (2010) Unacylated ghrelin rapidly modulates lipogenic and insulin signaling pathway gene expression in metabolically active tissues of GHSR deleted mice. *PloS one* 5:e11749.
- Dietrich MO, Horvath TL (2009) GABA keeps up an appetite for life. *Cell* 137:1177-1179.
- Dietrich MO, Horvath TL (2013) Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 36:65-73.
- Dimitrov EL, DeJoseph MR, Brownfield MS, Urban JH (2007) Involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the regulation of neuroendocrine corticotropin-releasing hormone neuronal activity. *Endocrinology* 148:3666-3673.
- Dube MG, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1992) Neuropeptide Y release is elevated from the microdissected paraventricular nucleus of food-deprived rats: an in vitro study. *Endocrinology* 131:684-688.
- Edwards A, Abizaid A (2017) Clarifying the Ghrelin System's Ability to Regulate Feeding Behaviours Despite Enigmatic Spatial Separation of the GHSR and Its Endogenous Ligand. *International journal of molecular sciences* 18.
- El-Brolosy MA, Stainier DYR (2017) Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS genetics* 13:e1006780.
- Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *The Journal of comparative neurology* 402:442-459.
- Els S, Schild E, Petersen PS, Kilian TM, Mokrosinski J, Frimurer TM, Chollet C, Schwartz TW, Holst B, Beck-Sickinger AG (2012) An aromatic region to induce a switch between agonism and inverse agonism at the ghrelin receptor. *Journal of medicinal chemistry* 55:7437-7449.
- Ellacott KL, Morton GJ, Woods SC, Tso P, Schwartz MW (2010) Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell metabolism* 12:10-17.
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD (1996) Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381:415-421.
- Espina V, Wulfkühle JD, Calvert VS, VanMeter A, Zhou W, Coukos G, Geho DH, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA (2006) Laser-capture microdissection. *Nature protocols* 1:586-603.
- Furness JB, Hunne B, Matsuda N, Yin L, Russo D, Kato I, Fujimiya M, Patterson M, McLeod J, Andrews ZB, Bron R (2011) Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse. *Neuroscience* 193:1-9.
- Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P (2008) Synaptic physiology of central CRH system. *European journal of pharmacology* 583:215-225.
- Gauna C, van de Zande B, van Kerkwijk A, Themmen AP, van der Lely AJ, Delhanty PJ (2007) Unacylated ghrelin is not a functional antagonist but a full agonist of the type 1a growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). *Molecular and cellular endocrinology* 274:30-34.
- Gehlert DR, Chronwall BM, Schafer MP, O'Donohue TL (1987) Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse* 1:25-31.
- Gelegen C, Collier DA, Campbell IC, Oppelaar H, Kas MJ (2006) Behavioral, physiological, and molecular differences in response to dietary restriction in three inbred mouse strains. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 291:E574-581.

- Geliebter A, Hashim SA, Gluck ME (2008) Appetite-related gut peptides, ghrelin, PYY, and GLP-1 in obese women with and without binge eating disorder (BED). *Physiology & behavior* 94:696-699.
- Gether U, Lin S, Kobilka BK (1995) Fluorescent labeling of purified beta 2 adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes. *The Journal of biological chemistry* 270:28268-28275.
- Gjerstad JK, Lightman SL, Spiga F (2018) Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress* 21:403-416.
- Goldstein JL, Zhao TJ, Li RL, Sherbet DP, Liang G, Brown MS (2011) Surviving starvation: essential role of the ghrelin-growth hormone axis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 76:121-127.
- Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Bruning JC (2005) Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature neuroscience* 8:1289-1291.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain research Molecular brain research* 48:23-29.
- Guo ZF, Ren AJ, Zheng X, Qin YW, Cheng F, Zhang J, Wu H, Yuan WJ, Zou L (2008) Different responses of circulating ghrelin, obestatin levels to fasting, re-feeding and different food compositions, and their local expressions in rats. *Peptides* 29:1247-1254.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience* 1:271-272.
- Hassouna R, Zizzari P, Tomasetto C, Veldhuis JD, Fiquet O, Labarthe A, Cognet J, Steyn F, Chen C, Epelbaum J, Tolle V (2014) An early reduction in GH peak amplitude in preproghrelin-deficient male mice has a minor impact on linear growth. *Endocrinology* 155:3561-3571.
- Henry FE, Sugino K, Tozer A, Branco T, Sternson SM (2015) Cell type-specific transcriptomics of hypothalamic energy-sensing neuron responses to weight-loss. *eLife* 4.
- Heppner KM, Piechowski CL, Muller A, Ottaway N, Sisley S, Smiley DL, Habegger KM, Pfluger PT, Dimarchi R, Biebermann H, Tschop MH, Sandoval DA, Perez-Tilve D (2014) Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors. *Diabetes* 63:122-131.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in neuroendocrinology* 24:151-180.
- Herman JP, Tasker JG, Ziegler DR, Cullinan WE (2002) Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: glutamate-GABA connections. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 71:457-468.
- Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *Journal of neuroendocrinology* 12:1047-1049.
- Hill JO, Wyatt HR, Peters JC (2012) Energy balance and obesity. *Circulation* 126:126-132.
- Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *Journal of neuroendocrinology* 14:259-268.
- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW (2003) High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Molecular endocrinology* 17:2201-2210.
- Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain research* 756:283-286.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and biophysical research communications* 279:909-913.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A,

- Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977.
- Inhoff T, Monnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Tache Y, Kobelt P (2008) Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 29:2159-2168.
- Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K, Japan Growth Genome C (2011) Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:E373-378.
- Inoue Y, Nakahara K, Maruyama K, Suzuki Y, Hayashi Y, Kangawa K, Murakami N (2013) Central and peripheral des-acyl ghrelin regulates body temperature in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 430:278-283.
- Jensen TL, Kiersgaard MK, Sorensen DB, Mikkelsen LF (2013) Fasting of mice: a review. *Laboratory animals* 47:225-240.
- Jobst EE, Enriori PJ, Cowley MA (2004) The electrophysiology of feeding circuits. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15:488-499.
- Joels M, Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *Nature reviews Neuroscience* 10:459-466.
- Kanizsai P, Garami A, Solymar M, Szolcsanyi J, Szelenyi Z (2009) Energetics of fasting heterothermia in TRPV1-KO and wild type mice. *Physiology & behavior* 96:149-154.
- Karatsoreos IN, Thaler JP, Borgland SL, Champagne FA, Hurd YL, Hill MN (2013) Food for thought: hormonal, experiential, and neural influences on feeding and obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:17610-17616.
- Khan AM, Walker EM, Dominguez N, Watts AG (2014) Neural input is critical for arcuate hypothalamic neurons to mount intracellular signaling responses to systemic insulin and deoxyglucose challenges in male rats: implications for communication within feeding and metabolic control networks. *Endocrinology* 155:405-416.
- Kim MS, Yoon CY, Park KH, Shin CS, Park KS, Kim SY, Cho BY, Lee HK (2003) Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 14:1317-1320.
- Klockars A, Levine AS, Olszewski PK (2018) Hypothalamic Integration of the Endocrine Signaling Related to Food Intake. *Current topics in behavioral neurosciences*.
- Kmiec Z, Pokrywka L, Kotlarz G, Kubasik J, Szutowicz A, Mysliwski A (2005) Effects of fasting and refeeding on serum leptin, adiponectin and free fatty acid concentrations in young and old male rats. *Gerontology* 51:357-362.
- Kobelt P, Wisser AS, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Tache Y, Monnikes H (2008) Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain research* 1204:77-86.
- Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52:948-956.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
- Kojima M, Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiological reviews* 85:495-522.
- Kovacs KJ (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry international* 33:287-297.
- Kovacs KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology* 20:665-672.
- Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB (2011) Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *The Journal of clinical investigation* 121:1424-1428.

- Krashes MJ, Shah BP, Madara JC, Olson DP, Storchlic DE, Garfield AS, Vong L, Pei H, Watabe-Uchida M, Uchida N, Liberles SD, Lowell BB (2014) An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature* 507:238-242.
- Kreutzberg GW (1969) Neuronal dynamics and axonal flow. IV. Blockage of intra-axonal enzyme transport by colchicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 62:722-728.
- Kronenberg H, Williams RH (2008) *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Kuperman Y, Weiss M, Dine J, Staikin K, Golani O, Ramot A, Nahum T, Kuhne C, Shemesh Y, Wurst W, Harmelin A, Deussing JM, Eder M, Chen A (2016) CRFR1 in AgRP Neurons Modulates Sympathetic Nervous System Activity to Adapt to Cold Stress and Fasting. *Cell metabolism* 23:1185-1199.
- Lam BYH, Cimino I, Poxel-Wolf J, Nicole Kohnke S, Rimmington D, Iyemere V, Heeley N, Cossetti C, Schulte R, Saraiva LR, Logan DW, Blouet C, O'Rahilly S, Coll AP, Yeo GSH (2017) Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing. *Molecular metabolism* 6:383-392.
- Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B (2013) Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell metabolism* 17:607-617.
- Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM (2002) Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143:155-162.
- Lear PV, Iglesias MJ, Feijoo-Bandin S, Rodriguez-Penas D, Mosquera-Leal A, Garcia-Rua V, Gualillo O, Ghe C, Arnoletti E, Muccioli G, Dieguez C, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F (2010) Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151:3286-3298.
- Leyris JP, Roux T, Trinquet E, Verdier P, Fehrentz JA, Oueslati N, Douzon S, Bourrier E, Lamarque L, Gagne D, Galleyrand JC, M'Kadmi C, Martinez J, Mary S, Baneres JL, Marie J (2011) Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to screen for ligands targeting the growth hormone secretagogue receptor type 1a. *Analytical biochemistry* 408:253-262.
- Li C, Chen P, Smith MS (2000) Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. *Brain research* 854:122-129.
- Li QC, Li QF, Wang YL, Sun HL, Jiang ZY (2018) Arcuate nucleus neurons are not essential for the preprandial peak in plasma ghrelin after neonatal monosodium glutamate treatment. *International journal of molecular medicine* 41:1635-1642.
- Liposits Z, Sievers L, Paull WK (1988) Neuropeptide-Y and ACTH-immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. An immunocytochemical analysis at the light and electron microscopic levels. *Histochemistry* 88:227-234.
- Liu T, Kong D, Shah BP, Ye C, Koda S, Saunders A, Ding JB, Yang Z, Sabatini BL, Lowell BB (2012) Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 73:511-522.
- Lopez Soto EJ, Agosti F, Cabral A, Mustafa ER, Damonte VM, Gandini MA, Rodriguez S, Castrogiovanni D, Felix R, Perello M, Raingo J (2015) Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *The Journal of general physiology* 146:205-219.
- Lu XY, Barsh GS, Akil H, Watson SJ (2003) Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7863-7872.
- Lufrano D, Trejo SA, Llovera RE, Salgueiro M, Fernandez G, Martinez Damonte V, Gonzalez Flecha FL, Raingo J, Ermacora MR, Perello M (2016) Ghrelin binding to serum albumin and its biological impact. *Molecular and cellular endocrinology* 436:130-140.

- Luque RM, Park S, Kineman RD (2007) Severity of the catabolic condition differentially modulates hypothalamic expression of growth hormone-releasing hormone in the fasted mouse: potential role of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 148:300-309.
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD (2005) NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310:683-685.
- Mani BK, Walker AK, Lopez Soto EJ, Raingo J, Lee CE, Perello M, Andrews ZB, Zigman JM (2014) Neuroanatomical characterization of a growth hormone secretagogue receptor-green fluorescent protein reporter mouse. *The Journal of comparative neurology* 522:3644-3666.
- Mary S, Damian M, Louet M, Floquet N, Fehrentz JA, Marie J, Martinez J, Baneres JL (2012) Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:8304-8309.
- Mason BL, Wang Q, Zigman JM (2014) The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annual review of physiology* 76:519-533.
- Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S (2006) Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides* 27:2321-2325.
- Mayorov AV, Amara N, Chang JY, Moss JA, Hixon MS, Ruiz DI, Meijler MM, Zorrilla EP, Janda KD (2008) Catalytic antibody degradation of ghrelin increases whole-body metabolic rate and reduces refeeding in fasting mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17487-17492.
- McGirr R, McFarland MS, McTavish J, Luyt LG, Dhanvantari S (2011) Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a. *Regulatory peptides* 172:69-76.
- Mear Y, Enjalbert A, Thirion S (2013) GHS-R1a constitutive activity and its physiological relevance. *Frontiers in neuroscience* 7:87.
- Mercer AJ, Stuart RC, Attard CA, Otero-Corchon V, Nillni EA, Low MJ (2014) Temporal changes in nutritional state affect hypothalamic POMC peptide levels independently of leptin in adult male mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 306:E904-915.
- Miranda RA, Torrezan R, de Oliveira JC, Barella LF, da Silva Franco CC, Lisboa PC, Moura EG, Mathias PC (2016) HPA axis and vagus nervous function are involved in impaired insulin secretion of MSG-obese rats. *The Journal of endocrinology* 230:27-38.
- Muller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, Batterham RL, Benoit SC, Bowers CY, Broglio F, Casanueva FF, D'Alessio D, Depoortere I, Geliebter A, Ghigo E, Cole PA, Cowley M, Cummings DE, Dagher A, Diano S, Dickson SL, Dieguez C, Granata R, Grill HJ, Grove K, Habegger KM, Heppner K, Heiman ML, Holsen L, Holst B, Inui A, Jansson JO, Kirchner H, Korbonits M, Laferrere B, LeRoux CW, Lopez M, Morin S, Nakazato M, Nass R, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Schwartz TW, Seeley RJ, Sleeman M, Sun Y, Sussel L, Tong J, Thorner MO, van der Lely AJ, van der Ploeg LH, Zigman JM, Kojima M, Kangawa K, Smith RG, Horvath T, Tschop MH (2015) Ghrelin. *Molecular metabolism* 4:437-460.
- Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B (2010) Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 518:943-962.
- Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal MS, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K (2002) Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *The Journal of endocrinology* 174:283-288.
- Mustafa ER, Lopez Soto EJ, Martinez Damonte V, Rodriguez SS, Lipscombe D, Raingo J (2017) Constitutive activity of the Ghrelin receptor reduces surface expression of voltage-gated Ca²⁺ channels in a CaVbeta-dependent manner. *Journal of cell science* 130:3907-3917.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198.
- Neary NM, Druce MR, Small CJ, Bloom SR (2006) Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. *Gut* 55:135.

- Nguyen AD, Mitchell NF, Lin S, Macia L, Yulyaningsih E, Baldock PA, Enriquez RF, Zhang L, Shi YC, Zolotukhin S, Herzog H, Sainsbury A (2012) Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PloS one* 7:e40191.
- Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM (2004) Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* 53:2552-2558.
- Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, Inui A (2011) Ghrelin and anorexia nervosa: a psychosomatic perspective. *Nutrition* 27:988-993.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135-138.
- Palkovits M (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain research* 59:449-450.
- Palkovits M (1983) Punch sampling biopsy technique. *Methods in enzymology* 103:368-376.
- Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, de Kerdanet M, Kadiro A, Epelbaum J, Le Bouc Y, Amselem S (2006) Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *The Journal of clinical investigation* 116:760-768.
- Park JB, Skalska S, Son S, Stern JE (2007) Dual GABAA receptor-mediated inhibition in rat presympathetic paraventricular nucleus neurons. *The Journal of physiology* 582:539-551.
- Parker E, Van Heek M, Stamford A (2002) Neuropeptide Y receptors as targets for anti-obesity drug development: perspective and current status. *European journal of pharmacology* 440:173-187.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
- Pedroso JA, Silveira MA, Lima LB, Furigo IC, Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, Buonfiglio DC, Teixeira PD, Frazao R, Donato J, Jr. (2016) Changes in Leptin Signaling by SOCS3 Modulate Fasting-Induced Hyperphagia and Weight Regain in Mice. *Endocrinology* 157:3901-3914.
- Perello M, Cabral A, Cornejo MP, De Francesco PN, Fernandez G, Uriarte M (2018) Brain accessibility delineates the central effects of circulating ghrelin. *Journal of neuroendocrinology* e12677.
- Perello M, Castrogiovanni D, Giovambattista A, Gaillard RC, Spinedi E (2009) Prolonged but not short negative energy condition restored corticoadrenal leptin sensitivity in the hypothalamic obese rat. *Neuroendocrinology* 89:276-287.
- Perello M, Gaillard RC, Chisari A, Spinedi E (2003) Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. *Neuroendocrinology* 78:176-184.
- Perello M, Sakata I, Birnbaum S, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Woloszyn J, Yanagisawa M, Lutter M, Zigman JM (2010) Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biological psychiatry* 67:880-886.
- Perello M, Scott MM, Sakata I, Lee CE, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Elmquist JK, Zigman JM (2012) Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *The Journal of comparative neurology* 520:281-294.
- Perello M, Stuart RC, Nillni EA (2007) Differential effects of fasting and leptin on proopiomelanocortin peptides in the arcuate nucleus and in the nucleus of the solitary tract. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292:E1348-1357.
- Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, Schobitz K, Pelaez B, Amat P, Rodriguez EM (2000) A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental brain research* 132:10-26.
- Petersen PS, Woldbye DP, Madsen AN, Egerod KL, Jin C, Lang M, Rasmussen M, Beck-Sickinger AG, Holst B (2009) In vivo characterization of high Basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology* 150:4920-4930.
- Polter AM, Barcomb K, Chen RW, Dingess PM, Graziane NM, Brown TE, Kauer JA (2017) Constitutive activation of kappa opioid receptors at ventral tegmental area inhibitory synapses following acute stress. *eLife* 6.
- Prevot V, Langlet F, Dehouck B (2013) Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain. *Aging* 5:332-334.

- Pritchard LE, Oliver RL, McLoughlin JD, Birtles S, Lawrence CB, Turnbull AV, White A (2003) Proopiomelanocortin-derived peptides in rat cerebrospinal fluid and hypothalamic extracts: evidence that secretion is regulated with respect to energy balance. *Endocrinology* 144:760-766.
- Roh E, Song DK, Kim MS (2016) Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental & molecular medicine* 48:e216.
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR (1998) A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139:4428-4431.
- Ruter J, Kobelt P, Tebbe JJ, Avsar Y, Veh R, Wang L, Klapp BF, Wiedenmann B, Tache Y, Monnikes H (2003) Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain research* 991:26-33.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T (2002) Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23:531-536.
- Sakata I, Nakano Y, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Lee CE, Perello M, Anderson JG, Coppari R, Xiao G, Lowell BB, Elmquist JK, Zigman JM (2009) Characterization of a novel ghrelin cell reporter mouse. *Regulatory peptides* 155:91-98.
- Salome N, Haage D, Perrissoud D, Moulin A, Demange L, Egecioglu E, Fehrentz JA, Martinez J, Dickson SL (2009) Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *European journal of pharmacology* 612:167-173.
- Sanchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM (2009) Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* 150:2283-2291.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36:199-211.
- Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H, Miyazato M, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Murakami N (2006) Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. *Biochemical and biophysical research communications* 350:598-603.
- Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M (2005) Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology* 146:2510-2516.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Grzanna R, Howe PR, Bloom SR, Polak JM (1985) Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *The Journal of comparative neurology* 241:138-153.
- Schalla MA, Stengel A (2018) The Role of Ghrelin in Anorexia Nervosa. *International journal of molecular sciences* 19.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9:676-682.
- Schneeberger M, Gomis R, Claret M (2014) Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *The Journal of endocrinology* 220:T25-46.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Segal-Lieberman G, Trombly DJ, Juthani V, Wang X, Maratos-Flier E (2003) NPY ablation in C57BL/6 mice leads to mild obesity and to an impaired refeeding response to fasting. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284:E1131-1139.
- Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N (2003) Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9:774-778.
- Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, Holst B (2013) Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *British journal of pharmacology* 170:1349-1362.

- Smart JL, Tolle V, Low MJ (2006) Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 116:495-505.
- Smith SM, Vale WW (2006) The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in clinical neuroscience* 8:383-395.
- Sohn JW (2015) Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB reports* 48:229-233.
- Spencer SJ, Emmerzaal TL, Kozicz T, Andrews ZB (2015) Ghrelin's Role in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Response: Implications for Mood Disorders. *Biological psychiatry* 78:19-27.
- Spencer SJ, Xu L, Clarke MA, Lemus M, Reichenbach A, Geenen B, Kozicz T, Andrews ZB (2012) Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biological psychiatry* 72:457-465.
- Steculorum SM, Collden G, Coupe B, Croizier S, Lockie S, Andrews ZB, Jarosch F, Klusmann S, Bouret SG (2015) Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *The Journal of clinical investigation* 125:846-858.
- Steinhagen-Thiessen E, Reznick AZ, Hilz H (1981) Positive and negative adaptation of muscle enzymes in aging mice subjected to physical exercise. *Mechanisms of ageing and development* 16:363-369.
- Stevanovic DM, Grefhorst A, Themmen AP, Popovic V, Holstege J, Haasdijk E, Trajkovic V, van der Lely AJ, Delhanty PJ (2014) Unacylated ghrelin suppresses ghrelin-induced neuronal activity in the hypothalamus and brainstem of male rats. *PloS one* 9:e98180.
- Steyn FJ, Leong JW, Huang L, Tan HY, Xie TY, Nelson C, Waters MJ, Veldhuis JD, Epelbaum J, Chen C (2012) GH does not modulate the early fasting-induced release of free fatty acids in mice. *Endocrinology* 153:273-282.
- Suda T, Tozawa F, Iwai I, Sato Y, Sumitomo T, Nakano Y, Yamada M, Demura H (1993) Neuropeptide Y increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Brain research Molecular brain research* 18:311-315.
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG (2003) Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and cellular biology* 23:7973-7981.
- Sun Y, Butte NF, Garcia JM, Smith RG (2008) Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology* 149:843-850.
- Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG (2004) Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:4679-4684.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 36:165-186.
- Takahashi KA, Cone RD (2005) Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. *Endocrinology* 146:1043-1047.
- Takahashi T, Ida T, Sato T, Nakashima Y, Nakamura Y, Tsuji A, Kojima M (2009) Production of n-octanoyl-modified ghrelin in cultured cells requires prohormone processing protease and ghrelin O-acyltransferase, as well as n-octanoic acid. *Journal of biochemistry* 146:675-682.
- Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85:4908-4911.
- Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, Nakao N, Nakai N, Nakashima K (2001) Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology* 142:3697-3700.
- Tasker JG, Herman JP (2011) Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 14:398-406.
- Thomas MA, Ryu V, Bartness TJ (2016) Central ghrelin increases food foraging/hoarding that is blocked by GHSR antagonism and attenuates hypothalamic paraventricular nucleus neuronal activation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 310:R275-285.

- Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, Baragli A, Rosso A, Granata R, Ghigo D, Pegoraro L, Ghigo E, Brizzi MF (2010) Unacylated ghrelin rescues endothelial progenitor cell function in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 59:1016-1025.
- Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143:1353-1361.
- Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB (2008) Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience* 11:998-1000.
- Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M (2006) Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147:2306-2314.
- Uchida A, Zigman JM, Perello M (2013) Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Frontiers in neuroscience* 7:121.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature reviews Neuroscience* 10:397-409.
- Uriarte M, De Francesco PN, Fernandez G, Cabral A, Castrogiovanni D, Lalonde T, Luyt LG, Trejo S, Perello M (2018) Evidence Supporting a Role for the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Transporting Circulating Ghrelin into the Brain. *Molecular neurobiology*.
- Valdivia S, Cornejo MP, Reynaldo M, De Francesco PN, Perello M (2015) Escalation in high fat intake in a binge eating model differentially engages dopamine neurons of the ventral tegmental area and requires ghrelin signaling. *Psychoneuroendocrinology* 60:206-216.
- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394-1397.
- van den Pol AN, Yao Y, Fu LY, Foo K, Huang H, Coppari R, Lowell BB, Broberger C (2009) Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:4622-4639.
- Veldhuis JD, Bowers CY (2010) Integrating GHS into the Ghrelin System. *International journal of peptides* 2010.
- Wang D, He X, Zhao Z, Feng Q, Lin R, Sun Y, Ding T, Xu F, Luo M, Zhan C (2015) Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Frontiers in neuroanatomy* 9:40.
- Wang J-C, Harris C Glucocorticoid signaling : from molecules to mice to man.
- Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y (2002) Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience letters* 325:47-51.
- Wang Q, Liu C, Uchida A, Chuang JC, Walker A, Liu T, Osborne-Lawrence S, Mason BL, Mosher C, Berglund ED, Elmquist JK, Zigman JM (2014) Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Molecular metabolism* 3:64-72.
- Waterson MJ, Horvath TL (2015) Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell metabolism* 22:962-970.
- Watts AG (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Frontiers in neuroendocrinology* 26:109-130.
- Wellman M, Abizaid A (2015) Growth Hormone Secretagogue Receptor Dimers: A New Pharmacological Target. *eNeuro* 2.
- Willesen MG, Kristensen P, Romer J (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70:306-316.
- Williams TD, Chambers JB, Henderson RP, Rashotte ME, Overton JM (2002) Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 282:R1459-1467.

- Wittmann G, Lechan RM, Liposits Z, Fekete C (2005) Glutamatergic innervation of corticotropin-releasing hormone- and thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain research* 1039:53-62.
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW (2004) Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8227-8232.
- Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540-2547.
- Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD (2009) Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell* 137:1225-1234.
- Xu Y, Elmquist JK, Fukuda M (2011) Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1243:1-14.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132:387-396.
- Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM (2011) Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146:992-1003.
- Yasrebi A, Hsieh A, Mamounis KJ, Krumm EA, Yang JA, Magby J, Hu P, Roepke TA (2016) Differential gene regulation of GHSR signaling pathway in the arcuate nucleus and NPY neurons by fasting, diet-induced obesity, and 17beta-estradiol. *Molecular and cellular endocrinology* 422:42-56.
- Yin X, Li Y, Xu G, An W, Zhang W (2009) Ghrelin fluctuation, what determines its production? *Acta biochimica et biophysica Sinica* 41:188-197.
- Yu CH, Chu SC, Chen PN, Hsieh YS, Kuo DY (2017) Participation of ghrelin signalling in the reciprocal regulation of hypothalamic NPY/POMC-mediated appetite control in amphetamine-treated rats. *Appetite* 113:30-40.
- Zakhari JS, Zorrilla EP, Zhou B, Mayorov AV, Janda KD (2012) Oligoclonal antibody targeting ghrelin increases energy expenditure and reduces food intake in fasted mice. *Molecular pharmaceutics* 9:281-289.
- Zeltser LM, Seeley RJ, Tschop MH (2012) Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nature neuroscience* 15:1336-1342.
- Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang JE, Lin S, Bao J, Wu P, Luo M (2013) Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:3624-3632.
- Zhao TJ, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Goldstein JL, Brown MS (2010) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:7467-7472.
- Zhu X, Cao Y, Voogd K, Steiner DF (2006) On the processing of proghrelin to ghrelin. *The Journal of biological chemistry* 281:38867-38870.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 494:528-548.
- Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones JE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, Williams TD, Lachey JL, Seeley RJ, Lowell BB, Elmquist JK (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation* 115:3564-3572.
- Zizzari P, Hassouna R, Longchamps R, Epelbaum J, Tolle V (2011) Meal anticipatory rise in acylated ghrelin at dark onset is blunted after long-term fasting in rats. *Journal of neuroendocrinology* 23:804-814.